

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie

Diplomová práce

**Role proteinu SMARCA5 (hSNF2H) v regulaci transkripce
vneseného DNA templátu**

Role of SMARCA5 (hSNF2H) during transcription of transfected
DNA template

Tomáš Zikmund

Školitel: MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

Ústav patologické fyziologie a Centrum experimentální hematologie
1. LF Univerzity Karlovy v Praze

2010

Tuto diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pod vedením školitele MUDr. Tomáše Stopky, Ph.D. a s využitím citovaných pramenů

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Tomáši Stopkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost.

Děkuji všem členům naší laboratoře za praktickou pomoc a vytvoření příjemného prostředí. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

OBSAH:

1	Abstrakt	5
2	Klíčová slova	5
3	Abstract	6
4	Keywords	6
5	Seznam zkratek	7
6	Literární přehled	9
6.1	Chromatin	9
6.2	Posttranslační modifikace histonů	11
6.3	Na ATP závislé chromatin remodelační komplexy	14
6.4	SMARCA5	16
6.4.1	hACF/WCRF	17
6.4.2	RSF	19
6.4.3	WICH	20
6.4.4	NoRC	22
7	Cíle diplomové práce	24
8	Materiály a metody	25
8.1	Materiály	25
8.1.1	Přístrojové vybavení	25
8.1.2	Chemikálie	25
8.1.3	Protilátky	27
8.1.4	Roztoky	28
8.1.5	Vektory	32
8.1.6	Primery	34
8.1.7	Organismy	35
8.2	Metody	36
8.2.1	Práce s tkáňovými kulturami	36
8.2.2	Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)	37
8.2.3	Southern blot	39
8.2.4	Ostatní	43
9	Výsledky	46
9.1	Vytvoření a optimalizace systému pro studium chromatin remodelujícího faktoru SMARCA5	46
9.2	Objasnění chromatinových změn v podmínkách zvýšené exprese proteinu SMARCA5 v navrženém buněčném systému	56
9.2.1	Nabohacení proteinu SMARCA5 na reportéru a represe transkripce reportéru	56
9.2.2	Protein SMARCA5 ovlivňuje nabohacení histonu H3	59
9.2.3	SMARCA5 ovlivňuje histonové modifikace reportéru včetně H3K4Me3	64
10	Diskuse	75
11	Závěr	79
12	Seznam použité literatury	80

1 Abstrakt

Vlastnosti buněk a tkání jsou výsledkem dynamické regulace genové exprese. DNA zabalená do proteinových struktur, souhrně označovaných jako chromatin, vyžaduje zapojení mechanismů regulujících přístupnost specifických sekvencí. U eukaryot hrají klíčovou roli při regulaci struktury chromatinu tzv. chromatin-remodelační enzymy, mezi které patří ISWI ATPáza SMARCA5. SMARCA5 se účastní řady biologických procesů na DNA včetně transkripce, přesto význam proteinu SMARCA5 v transkripci především ve vztahu ke změnám chromatinové struktury *in vivo* není zcela objasněn. Pro tento účel jsme vytvořili a optimalizovali systém, který nám umožnil sledovat vliv intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 na genovou expresi a vývoj chromatinové struktury uměle vneseného reportérového vektoru. Naše výsledky ukazují, že DNA vneseného reportérového vektoru byla nabohacena specificky tri-methylovanými molekulami histonu H3 na lyzinu 4 (H3K4Me3), které patří mezi známky aktivovaného chromatinu. Po nadprodukci proteinu SMARCA5 došlo v kódující sekvenci reportérového genu k ~2,5-3 násobnému zvýšení relativního nabohacení histonu H3 a jeho methylace (H3K4Me3). Vyšší zapojení molekul reportéru do procesu transkripce vedlo neočekávaně k poklesu reportérové aktivity oproti kontrole. Tyto výsledky podporují přítomnost chromatinové struktury na molekule transkribovaného plazmidu (Jeong and Stein 1994; Zhou, Santoro et al. 2002) a podporují naši novou hypotézu, že SMARCA5 může vyvolat represi transkripce reportérového vektoru způsobem, jenž pravděpodobně neovlivňuje nabohacení s aktivní transkripcí asociované histonové modifikace H3K4Me3.

2 Klíčová slova

ATP závislé chromatin remodelační komplexy, chromatin, histonové modifikace, hSNF2H, SMARCA5, transkripce

3 Abstract

Cellular and tissue characteristics are results of dynamic regulation of gene expression. DNA wrapped into proteins, referred to as chromatin, requires involvement of mechanisms guiding accessibility of specific sequences. In higher organisms, chromatin remodeling proteins are indispensable in regulating chromatin structure including ISWI ATPase SMARCA5. SMARCA5 is involved in almost any transaction on DNA including transcription, however precise *in vivo* role of SMARCA5 in these processes remains unknown. To advance understanding of specific role of SMARCA5 in the development of chromatin structure during transcription we devised cellular model in which SMARCA5 level is manipulated while chromatin structure development and transcriptional response are monitored. Our data indicate that the transfected DNA template that is transcribed is enriched with histone H3 and its specific methylation of Histone H3 lysine (K) 4, a mark of active chromatin structure. Overexpression of SMARCA5 results within the reporter gene coding sequence in ~2.5-3 fold increase of both H3 occupancy and its modification H3K4Me3. Increased DNA template commitment into chromatinization is associated with repression of reporter gene expression. These results are supported by studies indicating dynamic development of nucleosomal structure on the plasmid reporter dependently on SMARCA5 (Jeong and Stein 1994; Zhou, Santoro et al. 2002), however indicate that overexpressed SMARCA5 represses transcription by mechanisms not involving a decrease of H3K4Me3.

4 Keywords

ATP-dependent chromatin-remodeling complexes, chromatin, histone modification, hSNF2H, SMARCA5, transcription

5 Seznam zkratek

AML	Akutní myeloidní leukémie
ATP	Adenosin trifosfát
CHD	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů (Chromodomain and helicase-like domain)
ChIP	Chromatinová imunoprecipitace
D-MEM	Médium pro kultivaci buněčných linií (Dulbeccos Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Chelatační činidlo kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Chelatační činidlo kyselina ethylenglykol tetraoctová
EtBr	Interkalační činidlo ethidium bromid, které se používá pro detekci nukleových kyselin
FBS	Fetální bovinní sérum
HEPES	Pufrovací činidlo kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová
HP1	Heterochromatinový protein 1
INO80	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů (Inositol requiring 80)
ISWI	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů (Imitation SWI)
MAPK	Mitogeny aktivovaná proteinkináza
NFκB	Regulátor genové exprese nukleární faktor kappa B
NM1	Jaderný myosin, který hraje roli mimo jiné v transkripci rDNA (Nuclear myosin 1)
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PCNA	Takzvaný „svorkovací“ protein, který zvyšuje procesivitu některých DNA polymeráz. Je trimerním komplexem, jenž může sloužit jako vazebná platforma pro řadu proteinů důležitých např. v replikaci DNA a chromatinu, v regulaci buněčného cyklu a v opravách poškozené DNA (Proliferating cell nuclear antigen)
PHD	Vazebná doména, která některým proteinům umožňuje interakci s methylovanými lyziny histonů (Plant homeodomain)
PLU-1	Specifická demethyláza histonu H3K4Me3
P/S	Označení roztoku antibiotik Penicillinu a Streptomycinu
q-PCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RBP2	Specifická demethyláza histonu H3K4Me3 (Retinoblastoma binding protein 2)
rDNA	ribozomální DNA; jako rDNA jsou označovány geny, které kódují ribozomální RNA
SMARCA5	Na ATP závislý chromatin remodelující faktor, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI proteinových komplexů (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5)

SWI/SNF	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů (Mating type switch/sucrose nonfermenting)
wt	Genový produkt (protein) nemutované alely. Jedinec s původním fenotypem. (wild type)

6 Literární přehled

6.1 Chromatin

Jaderné chromozómy eukaryot jsou vystavené z DNA, RNA a proteinů. Hlavní proteinovou složkou chromozomů jsou specializované molekuly umožňující pravidelnou kondenzaci vedoucí k postupnému balení velice dlouhých řetězců DNA do menších rozměrů tak, aby se bez problémů vešly do buněčného jádra. Tento komplex DNA a proteinů se nazývá chromatin. Struktura chromatinu je velice dynamická a v průběhu buněčného cyklu se mění. Příkladem může být rozdíl mezi interfázními chromozómy, které jsou tvořené rozvolněným chromatinem – tzv. euchromatinem a mitotickými chromozómy, které jsou tvořené výhradně z kondenzovaného chromatinu – tzv. heterochromatinu. Mitotické chromozómy tak mají oproti interfázním menší objem a mohou v průběhu buněčného dělení pravděpodobně snadněji segregovat do dceřiných buněk. Molekula DNA je uvnitř chromatinu velice organizovaně uspořádaná a způsob tohoto uspořádání mohou eukaryotní buňky ovlivňovat i lokálně a to nejen na úrovni chromozomů. Protože zvýšením kondenzace chromatinu se DNA stává méně přístupnou svým vazebným faktorům, například faktorům transkripčního aparátu, je lokální změna uspořádání chromatinu jeden z důležitých mechanismů regulace genové exprese.

V jaderných chromozómech eukaryot existuje několik různých stupňů kondenzace chromatinu. Tím prvním a základním stupněm je nukleozóm, který tvoří 8 histonových proteinů a DNA o velikosti 157 a 240 nukleotidů (Richmond and Davey 2003). Nukleozómy jsou od sebe vzdáleny v pravidelných rozestupech a svým uspořádáním připomínají na rozvolněném vlákně chromatinu „korálky na provázku“ (angl. beads-on-a-string). Vláknko „korálků na provázku“ má průměr 11 nm. Dalším stupněm kondenzace chromatinu je vláknko o průměru 30 nm. V tomto stupni kondenzace jsou jednotlivé nukleozómy k sobě natěsněno přiblížené díky vazbě tzv. linkerových histonových proteinů. Předpokládá se, že právě 30 nm vláknko vytváří euchromatinové oblasti interfázních chromozomů. Následným ohýbáním a balením 30 nm vlákna do smyček vznikají vysoce kondenzované struktury heterochromatinu. Výstavby těchto struktur se mimo jiné účastní proteinové „lešení“ (angl. scaffold) na které se 30 nm vláknko připojuje.

Jak bylo uvedeno výše, základním stupněm kondenzace chromatinu je nukleozóm. Nukleozóm se skládá ze dvou částí – ze 147 bp dlouhé DNA navinuté na histonový oktamer tzv. nukleozomového jádra a úseku DNA propojujícího sousední nukleozóm (angl. linker).

V závislosti na typu buňky (např. stupni diferenciace) a eventuálně živočišném druhu může být délka tohoto úseku okolo 20 až 100 nukleotidů. Nukleozomové jádro tvoří čtveřice histonů – H2A, H2B, H3 a H4, které jsou v něm zastoupeny vždy ve dvou kopiích. Tyto histony mají ve své proteinové molekule vysoký obsah bazických aminokyselin zejména lyzinu a argininu, které jim umožňují interagovat s negativně nabitými fosfátovými skupinami v DNA. Interakce bazických aminokyselin a fosfátových skupin je nejčtetnější druhem vazby mezi histony a DNA v nukleozomovém jádře. Lokalizace nukleozomů v chromatinu proto prakticky nezávisí na nukleotidové sekvenci DNA (Luger, Mader et al. 1997). Dále se do struktury nukleozómu začleňuje histon H1. Histon H1 je tzv. „linkerový“, protože váže propojující úsek DNA (linker) v místech jeho vstupu nebo výstupu z nukleozomového jádra (Sivolob and Prunell 2003). Vazbou „linkeru“ určuje jeho orientaci v prostoru a tím pravděpodobně řídí vznik 30 nm chromatinového vlákna a jeho orientaci. Komplexu nukleozómu s histonem H1 se také někdy říká chromatozóm.

Každý z histonů nukleozomového jádra vlastní globulární doménu a nestrukturovaný N-konec, který vyčnívá ven z nukleozómu. N-konce společně s dlouhými C-konci histonů H2A a H2B se pro svoji flexibilitu označují jako tzv. „histone tails“. Tyto „tails“ histonů hrají důležitou roli v regulaci chromatinové struktury, protože jsou předmětem mnohačetných posttranslačních modifikací. Existují dva hlavní mechanismy, kterými mohou posttranslační modifikace histonů ovlivnit strukturu chromatinu. Tím prvním je, že modifikace odstíní náboj konkrétní aminokyseliny (především lyzin) histonu důležité pro kontakt mezi dvěma nukleozómy nebo pro vazbu histonu s DNA. Ovlivnění náboje pak může vést až k přerušení mezihistonových kontaktů přilehlých nukleozomů a rozvolnění vlákna chromatinu. Další mechanismus je založen na rozeznání posttranslačních modifikací aminokyselin N-konců histonů nehistonovými proteiny. V tomto případě slouží histonové N-konce jako platforma pro vazbu proteinů, které s sebou mohou přinést například enzymatické aktivity, schopné dále měnit strukturu chromatinu (Kouzarides 2007). Vazba konkrétního proteinu na histonový N-konec vyžaduje správný sled různých postranslačních modifikací. Souhrn těchto „sekvencí“ posttranslačních modifikací rozeznávaných vazebnými proteiny histonů se, vzhledem k jejich funkčnímu, ač zatím zcela nepoznanému významu, který připomíná některé regulace na úrovni DNA, označuje jako histonový kód. Je potřeba zmínit, že důležité buněčné procesy - například transkripce, replikace či opravy DNA - jsou velice organizované a doprovázené řadou mnoha změn ve struktuře chromatinu. Každá jednotlivá změna struktury chromatinu může vyžadovat různé typy enzymatických aktivit, schopných chromatinovou strukturu měnit tzv. ji remodelovat. Buňky jsou schopny skrze rozličné enzymatické molekuly specificky

vytvářet a měnit různé sekvence posttranslačních modifikací histonů, tak aby byly těmito enzymatickými aktivitami a dalšími faktory eventuelně rozeznány.



Obrázek 6-1: Obrázek byl převzatý v nezměněné podobě z následující práce (Luger, Mader et al. 1997). Je na něm zobrazená krystalová struktura nukleozomového jádra ve dvou na sebe kolmých orientacích. Na obrázku je vyznačeno osm histonů – H2A (žlutě), H2B (červeně), H3 (modře), H4 (zeleně) v komplexu se 146 bp dlouhou dvoušroubovicovou DNA (komplementární vlákna DNA jsou zbarvena hnědě a tyrkysově).

6.2 *Posttranslační modifikace histonů*

Buňkami přesně regulovaný vznik posttranslačních modifikací na aminokyselinách histonových N-konců, jak už bylo řečeno, pomáhá řídit kondenzaci popřípadě rozvolnění chromatinové struktury. Za pomoci současných molekulárně-biologických metod bylo zjištěno, že pro oblasti chromozómu s rozvolněnou chromatinovou strukturou (euchromatinem) je typická přítomnost histonových modifikací, které se v kondenzovaných heterochromatinových oblastech téměř nevyskytují. Protože rozvolněná a kondenzovaná forma chromatinu souvisí s odlišnou transkripční aktivitou, mohou být tyto poznatky použity například k nepřímému určování pravděpodobné exprese genů (transkripce) v dané oblasti chromozómu (viz. dále).

Histony nukleozomového jádra mohou být modifikovány na mnoha místech své molekuly. Doposud bylo na histonech objeveno více než 60 různých posttranslačně modifikovatelných aminokyselinových zbytků a osm různých typů modifikací. Je potřeba zmínit, že všechny možné posttranslační modifikace se na molekule daného histonu nevyskytují současně. Spíše dochází ke specifickému modifikování jen několika postranních řetězců aminokyselin daného histonu, které například vytváří sekvenci histonového kódu rozeznatelnou vazebnými faktory. Mezi nejčastěji studované posttranslační modifikace patří acetylace, methylace a fosforylace.

K acetylaci nejčastěji dochází na N-koncových aminokyselinách histonových N-konců, protože jsou, na rozdíl od globulárních domén, přístupnější modifikujícím enzymům. Acetylují se vždy postranní řetězce aminokyseliny lyzinu (značena písmenem K) a reakci katalyzují enzymy zvané acetyltransferázy. Tyto enzymy jsou většinou specifické pro více lyzinů. Jedna acetyltransferáza tak může například modifikovat aminokyselinové lyzinové zbytky, které se vyskytují v různých pozicích (různých vzdálenostech od N-konce molekuly histonu) a dokonce i na různých histonech. Acetylace se objevuje hlavně v euchromatinových oblastech a je typickou známkou aktivované transkripce. U aktivně transkribovaných genů se acetylace vyskytuje především na specifických místech v promotoru a 5' konci kódující oblasti (Liu, Kaplan et al. 2005). Jedním z mechanismů, kterým může acetylace ovlivnit vysoce uspořádanou strukturu chromatinu a tím i transkripci, přináší některé současné *in vitro* studie. Tyto studie naznačují, že pro vytvoření 30 nm vlákna jsou důležité nekovalentní vazby mezi nukleozómy. Tyto vazby jsou zprostředkované kontaktem aminokyselin histonu H4 v pozici 14-19 s oblastí záporně nabitých aminokyselin sousedního nukleozómu. Oblast záporně nabitých aminokyselin se nachází především na histonu H2A (Dorigo, Schalch et al. 2003). Ukazuje se, že zvláštní úlohu v těchto interakcích hraje bazická aminokyselina lyzin histonu H4 v pozici 16 (psáno H4K16). Za pomoci technik chemické ligace byl vytvořen rekombinantní histon H4, který byl acetylován pouze na tomto lyzinu v pozici 16 (psáno H4K16Ac). Nukleozómy s inkorporovaným H4K16Ac nebyly schopné vytvořit 30 nm vlákno chromatinu (Shogren-Knaak, Ishii et al. 2006). Acetylace může dále sloužit také jako vazebná platforma, protože je rozeznávána specifickými doménami – bromodomény – proteinů vázajících chromatin. Jako většina posttranslačních modifikací, je i acetylace modifikací vratnou. Odstranění acetylové skupiny (deacetylaci) katalyzují enzymy, které se nazývají histonové deacetylázy. Deacetylace je obvykle spojena s represí transkripce.

Další důležitou posttranslační modifikací histonů je methylace. K methylaci dochází především na postranních řetězcích aminokyselin lyzinu a argininu za enzymatické účasti

methytransferáz. Jednotlivé lyziny a argininy mohou být methytransferázami modifikovány i několikrát po sobě. Lyziny se tak mohou vyskytovat v mono-, di- a trimethylované formě, argininy pak v mono a dimethylované formě. Methytransferázy, zvláště ty lyzinové, jsou na rozdíl od předchozích acetyltransferáz velice specifickými enzymy a mají obvykle schopnost methylovat pouze jednu konkrétní aminokyselinu na konkrétním histonu. Methylace histonů může mít represivní nebo aktivační vliv na transkripci. V současnosti nejprostudovanějšími místy methylace histonů jsou H3K4 a H3K9. Komplexní analýzy kvasinkového genomu naznačují, že methylace na H3K4 se vyskytuje především v místech aktivní transkripce. H3K4 trimethyl (psáno H3K4Me3) je nabohacen na 5' konci aktivních genů a interaguje s ním aktivovaná forma RNA polymerázy II (Liu, Kaplan et al. 2005). Methylace H3K9 naopak asociuje s transkripční represí. H3K9Me3 je modifikace, která je schopná umlčet geny přímo – vazbou heterochromatinového proteinu 1 (HP1) a nepřímo – přes histonové methytransferázy. Tento model se uplatňuje i při tvorbě vysoce kondenzovaných heterochromatinových oblastí. Histonové methytransferázy asociující s HP1 methylují H3K9 ve své bezprostřední blízkosti, čímž vytváří nová vazebná místa pro další HP1. Nově vázaný HP1 asociuje s další methytransferázou a celý proces se znovu opakuje - dochází k tzv. rozšiřování (angl. „spreading“) heterochromatinu. Mezi další methylované histony, které souvisí s aktivací a represí transkripce patří H3K36, H3K79 respektive H3K27, H4K20 (Kouzarides 2007). Je potřeba říci, že methylace nemění kladný náboj aminokyseliny lyzinu (popřípadě argininu). Je tedy nepravděpodobné, aby tato modifikace ovlivňovala strukturu chromatinu rušením interakcí založených na rozdílu v náboji, jako je tomu v případě acetylce. Methylace ovlivňuje buněčné procesy spíše vazbou proteinů, které mají specifické domény rozeznávající methylovaný lyzin – např. PHD a domény podobné chromo (chromo, MBT, tudor).

Fosforylace histonů je katalyzovaná kinázami, které připojují fosfátovou skupinu na postranní řetězce aminokyseliny serinu (i threoninu). Oproti předchozím dvěma modifikacím je toho o funkci fosforylace histonů v transkripci mnohem méně známo. Jedním z důvodů může být i ten, že se tato modifikace histonů objevuje především po aktivaci několika různých buněčných signálních drah. Příkladem může být fosforylace H3S10. Tato modifikace se v interfázi mimo jiné účastní aktivace „bezprostředně časných“ (angl. „immediate-early“) genů MAP kinázové dráhy např. c-jun a c-fos (Clayton, Rose et al. 2000) a aktivace genů dráhy NFκB (Yamamoto, Verma et al. 2003). Paradoxně fosforylace H3S10 nehraje roli pouze v aktivaci transkripce, ale objevuje se také ve vysoce kondenzovaných (transkripčně neaktivních) mitotických chromozómech (Hans and Dimitrov 2001). Mechanismus

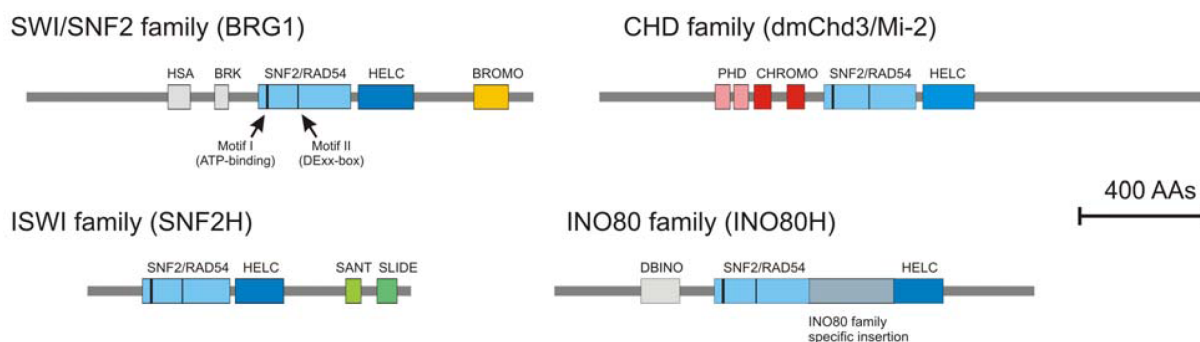
fungování, jakým fosforylace histonů ovlivňuje chromatinovou strukturu, není také plně objasněn. Nabízí se možnost, že negativně nabitý fosfát snižuje kladný náboj histonů, čímž může ovlivnit interakce histonu s histonem nebo histonu s DNA. Dále může fosforylace, jako předchozí dvě modifikace, sloužit pro vazbu nehistonových proteinů (Macdonald, Welburn et al. 2005).

6.3 Na ATP závislé chromatin remodelační komplexy

Jak už bylo uvedeno, jsou důležité biologické procesy eukaryotních buněk, jako například transkripce, replikace a opravy DNA, doprovázené organizovanými změnami ve struktuře chromatinu. Kritickou úlohu v těchto organizovaných změnách struktury hrají již zmiňované enzymy, které posttranslačně modifikují histony a dále tzv. na ATP závislé chromatin remodelující faktory. ATP závislé chromatin remodelující faktory, mezi které patří protein SMARCA5, využívají energii z hydrolýzy ATP k přerušení nekovalentních interakcí mezi DNA a histony. Tyto faktory tak mohou ve výsledku vytvářet, odstraňovat, destabilizovat, restrukturalizovat nukleozómy nebo s nukleozómy pohybovat v obou směrech podél vlákna DNA (Cairns 2007). In vitro studie ukazují, že mnoho z těchto enzymů je schopno katalyzovat lokální rozrušení chromatinové struktury v blízkosti vazebných míst pro různé sekvenčně specifické DNA vazebné faktory a ATP. Tento proces je někdy označován jako remodelace chromatinu (angl. chromatin remodeling). ATP závislé chromatin remodelující faktory obvykle vyžadují pro svou funkci navázání dalších proteinů a společně s nimi vytváří tzv. na ATP závislé chromatin remodelační komplexy.

Katalytické podjednotky na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů patří do proteinové nadrodiny SWI2/SNF2 a všechny obsahují ve své polypeptidické molekule evolučně konzervovanou ATPázovou doménu. V rámci nadrodiny SWI2/SNF2 jsou katalytické podjednotky rozděleny do čtyř hlavních podrodin (SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80) a to podle toho jaké vlastní další funkční domény. Funkční domény slouží těmto enzymům především k vazbě nukleozomů a rozeznání kovalentních modifikací histonů. Proteiny podrodiny SWI/SNF (Mating type switch/sucrose nonfermenting) obsahují, mimo své ATPázové domény, ještě doménu HSA (Helicase-SANT) a C-koncovou bromodoménu, která rozeznává acetylované lyziny. Savčím homologem proteinů SWI/SNF je například molekula BRG1. Členové rodiny ISWI (Imitation SWI) mají na svém C-konci molekuly vazebné motivy SANT a SLIDE. Doména SANT je sekvenčně příbuzná, ale pravděpodobně funkčně odlišná, s DNA vazebným motivem proteinu c-Myb (Grune, Brzeski et al. 2003). Zdá se, že

její hlavní funkcí je vazba histonových N-konců (Boyer, Latek et al. 2004). Doména SLIDE (SANT-like domain) je vazebný motiv sekvenčně příbuzný se SANT a předpokládá se, že také hraje důležitou roli v rozeznávání nukleozomů proteiny z rodiny ISWI (Grune, Brzeski et al. 2003). Zástupce ATPáz rodiny ISWI u člověka jsou proteiny SMARCA1 (hSNF2L) a SMARCA5 (hSNF2H). Další skupinou proteinů nadrodiny SWI2/SNF2 jsou ATPázy CHD (Chromodomain and helicase-like domain). Tyto remodelační faktory mají, typicky N-koncově od ATPázové domény, dvě tandemově uspořádané chromodomény, které jim umožňují interagovat s methylovanými histony. Dále k N-konci jejich molekuly se u některých členů CHD rodiny (např. dChd3/Mi-2 u *D. melanogaster* a CHD3/Mi-2 α , CHD4/Mi-2 β u člověka) mohou vyskytovat dvě domény tzv. PHD (Plant homeodomain) finger. PHD finger jsou zinkovému prstu podobné (angl. Zn-finger-like) motivy, které umožňují interagovat s methylovanými lyziny histonů. Poslední zmiňovanou skupinou ATPáz jsou proteiny INO80 (Inositol requiring 80). Členové rodiny INO80, stejně jako ostatní z proteinové rodiny SWI2/SNF2, mají aminokyselinovou inzerci ve své ATPázové doméně. Pro remodelační faktory INO80 je však typické, že je tato specifická inzerce velice dlouhá (~300 aminokyselin) a může pravděpodobně plnit funkci vazebného místa pro interakční partnery v ATP závislých chromatin remodelačních komplexech (Jonsson, Jha et al. 2004). Dále tyto proteiny obsahují evolučně konzervovanou sekvenci, která je vzdálená přibližně 100 aminokyselin od ATPázové domény směrem k N-konci. Počítačové analýzy naznačují, že by tato sekvence aminokyselin mohla vytvořit prostorovou strukturu – tzv. doménu DBINO (DNA binding domain of INO80) – schopnou vázat DNA (Bakshi, Prakash et al. 2004).



Obrázek 6-2: Obrázek byl převzatý v nezměněné podobě z následující práce (Kokavec, Podskocova et al. 2008). Na obrázku jsou vyobrazeny primární struktury některých zástupců proteinových rodin SWI/SNF2, ISWI, CHD a INO80. Velikosti jednotlivých domén jsou ukázány v poměru k velikosti proteinu. Remodelační faktory proteinové nadrodiny SWI2/SNF2 obsahují ATPázovou doménu s inzercí, která tuto doménu rozděluje na dvě části – SNF2/RAD54 (světlomodře) a HELC (tmavomodře). Podrodiny SWI/SNF2, ISWI a CHD mají tuto inzerci krátkou, podrodina INO80 dlouhou (šedě). Každá podrodina se od sebe dále liší přítomností dalších funkčních domén v jejich molekule – bromodoména (žlutě), chromodoména (červeně), doména DBINO (bíle), doména HSA (bílý ohraničený obdelník), doména PHD (růžově), domény SANT a SLIDE (zeleně).

Jednotlivé na ATP závislé chromatin remodelační komplexy se od sebe liší nejen v ATPáze z proteinové nadrodiny SWI2/SNF2, ale také složením nekatalytických podjednotek. Funkcí těchto nekatalytických podjednotek je, tedy alespoň v případě ISWI proteinu SMARCA5, pravděpodobně regulace aktivity ATPázové podjednotky (He, Fan et al. 2008). Protein SMARCA5 může být u člověka součástí doposud poznanych pěti na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů, které se od sebe liší různými biologickými funkcemi a také odlišnou lokalizací v jádře. Mezi ně patří – hACF/WCRF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor/ Williams syndrome transcription factor-related chromatin remodeling factor), hCHRAC (chromatin accessibility complex), WICH (Williams syndrome transcription factor-imitation switch), RSF (remodeling and sparing factor) a NoRC (Nucleolar remodeling komplex). Jedním z důvodů, proč mají stejné ATPázové podjednotky v různých remodelačních komplexech odlišné specifity k substrátu (lokalizaci v jádře) přispívá i fakt, že nekatalytické podjednotky mohou také obsahovat vazebné motivy rozeznávající histony. Například několik nekatalytických vazebných partnerů enzymu SMARCA5 se řadí do tzv. BAZ proteinové rodiny (Bromodomain adjacent zinc finger), které mají na C-konci své polypeptidické molekuly domény PHD finger a bromodoménu. Mezi tyto proteiny patří mimo jiné hACF1/BAZ1A, WSTF/BAZ1B a TIP5/BAZ2A (Jones, Hamana et al. 2000).

6.4 SMARCA5

Expese 135 kDa velkého (1052 aminokyselin) proteinu Smarca5 je pro buňky savců důležitá z následujících důvodů. Analýzy exprese mRNA proteinu Smarca5 naznačují, že transkripce tohoto na ATP závislého chromatin remodelujícího faktoru probíhá v mnoha diferenciovaných myších tkáních. Expese je výrazná především v kostní dřeni, slezině, placentě a děloze (Stopka, Zakova et al. 2000; Lazzaro and Picketts 2001). Zvýšená hladina RNA transkriptu proteinu Smarca5 se dále objevuje v proliferujících buněčných populacích například vaječníků, varlat a mozku v průběhu jeho časného vývoje. Postnatálně pak v mozku tato vysoká hladina RNA transkriptu značně klesá, což pravděpodobně souvisí s diferenciací buněk (Lazzaro and Picketts 2001). Podobně bylo výrazné snížení exprese mRNA proteinu Smarca5 pozorováno v průběhu erythroidní diferenciaci a diferenciaci proliferujících AML CD34⁺ hematopoetických progenitorů, která asociuje s remisí tohoto leukemického onemocnění (Stopka, Zakova et al. 2000). Některé práce, jež se zabývají snížením intracelulární hladiny mRNA proteinu SMARCA5 za pomoci antisense oligonukleotidů, dále

ukazují, že protein SMARCA5 je přímo vyžadován pro proliferaci a diferenciaci CD34⁺ hematopoetických progenitorů (Stopka and Skoultschi 2003). Protein Smarca5 je esenciální pro vývoj savců v jejich časných stádiích vývoje. Studie využívajících tzv. knockout myších modelů s delecí genu *Smarca5* přináší důkaz o tom, že *Smarca5* ^{-/-} homozygoti umírají přibližně okolo pátého dne embryonálního vývoje v průběhu časně gastrulace po implantaci embrya. *Ex vivo* kultivace *Smarca5* ^{-/-} blastocyst naznačují, že po třech až šesti dnech od jejich izolace dochází k zastavení růstu buněk trofoblastu a ICM a následně k masivní apoptóze těchto buněk (Stopka and Skoultschi 2003). Homozygotní myší embrya s missense mutací genu *Smarca5*, jež způsobuje záměnu evolučně konzervovaného aminokyselinového zbytku W520R v molekule proteinu, vykazují v pozdní fázi gestace vážné vývojové poruchy. Je velice nepravděpodobné, že by se homozygotní jedinci s těmito poruchami vývoje dožívali porodu (Chong, Vickaryous et al. 2007). Vliv mutované alely proteinu *Smarca5* je patrný i u heterozygotních jedinců, protože oproti wt jedincům se vyznačují až o 10% menším vzrůstem (Chong, Vickaryous et al. 2007).

Protein SMARCA5 je v interfázních buňkách lokalizován především v oblastech euchromatinu a v menší míře také v heterochromatinu a jádru (Vargova, Vargova et al. 2009). Lokalizace proteinu SMARCA5 v jádru může pravděpodobně souviset s tím, v jakém na ATP závislém chromatin remodelačním komplexu se tento protein vyskytuje. Jak již bylo řečeno nekatalytické podjednotky na ATP závislých chromatin remodelujících komplexů s nimiž protein SMARCA5 asociuje, mohou regulovat a měnit afinitu tohoto proteinu ke svému substrátu – chromatinu (He, Fan et al. 2008). Zároveň se tyto komplexy účastní řady, v jádru různě lokalizovaných, biologických procesů jako například transkripce, replikace, opravy DNA a rekombinace. V následujících odstavcích budou popsány hlavní chromatin remodelační funkce proteinu SMARCA5 respektive komplexů, v nichž se tento protein vyskytuje. Zaměřil jsem se především na komplexy hACF/WCRF, RSF, WICH a NoRC protože některá současná literatura přináší důkazy o jejich účasti v regulaci transkripce.

6.4.1 hACF/WCRF

Lidský (angl. *human*) komplex hACF byl u člověka poprvé izolován z buněk HeLa. Tento komplex tvoří dvě podjednotky - proteiny SMARCA5 a ACF1. Protein ACF1 je 190 kDa velký polypeptid a jak naznačují některé in vitro studie, dokáže měnit remodelační aktivitu proteinu SMARCA5 (He, Fan et al. 2006; He, Fan et al. 2008). Jednou z vlastností proteinu SMARCA5 je, že ovlivňuje mobilitu nukleozomů, díky čemuž může měnit jejich

rozestupy na vlákne DNA. Tento proces je charakterizován posunem neboli „klouzáním“ (angl. sliding) nukleozomálních histonů vůči DNA. Protein SMARCA5 k této aktivitě pravděpodobně vyžaduje minimální délku „linkerové“ DNA mezi dvěma sousedními histonovými oktamerem (He, Fan et al. 2006). Studie ukazuje, že ve vazbě s proteinem ACF1 se tato potřeba minimální délky nukleozomálního přesahu proteinu SMARCA5 mění, protože remodelační komplex hACF dosahuje optimální katalytické aktivity až při delším přesahu DNA (He, Fan et al. 2006). Práce dalších autorů, kteří využili metodu FRET (Forster resonance energy transfer) pro sledování mobility nukleozómu katalyzovanou komplexem hACF v reálném čase naznačují, že komplex hACF může vytvářet stejně dlouhé přesahy DNA po obou stranách nukleozómu. Komplex hACF pravděpodobně pohybuje histonovým oktamerem ve směru delšího přesahu DNA rychleji než ve směru kratšího, takže po ustanovení dynamické rovnováhy může docházet k vytvoření pravidelných rozestupů mezi nukleozómy (Yang, Madrid et al. 2006). Vytváření pravidelných rozestupů mezi nukleozómy komplexem hACF na templátové DNA popisují práce dalších autorů (LeRoy, Loyola et al. 2000).

In vitro analýzy komplexu ACF v mouše *D. melanogaster* (dACF), který je homologní jak v kompozici jednotlivých podjednotek tak i své funkci k lidskému komplexu hACF, naznačují, že se může také účastnit vytváření chromatinové struktury. Vytváření chromatinové struktury (angl. chromatin assembly) je proces, v jehož průběhu dochází k balení DNA okolo nukleozomového jádra. V širším měřítku pak sestavování chromatinu zahrnuje i vazbu nehistonových proteinů na DNA a vytvoření vyšších stupňů kondenzace této struktury. Proces sestavování chromatinu *in vivo* je důležitý například při replikaci genomové DNA, kdy buňky na nově syntetizované DNA sestavují nukleozómy a vytváří se chromatinová struktura. Dále je sestavování nukleozomů na DNA významné například v procesu transkripce, protože struktura chromatinu má zásadní vliv na expresi genů. *In vitro* analýzy ukazují, že purifikovaný komplex dACF má vliv na sestavování chromatinové struktury pravidelně rozestoupených nukleozomů na holé DNA v přítomnosti ATP, purifikovaných nukleozomálních histonů a histonového chaperonu dNAP-1 (Ito, Levenstein et al. 1999). Podobné výsledky byly dosaženy i s použitím lidského komplexu hACF a histonového chaperonu dNAP-1 (LeRoy, Loyola et al. 2000). Pokud je templátová DNA v této reakci relaxovaná, pak komplex ACF pravděpodobně neslouží pouze jako faktor, který katalyzuje vytvoření pravidelných nukleozomálních rozestupů, ale zřejmě je nutný i pro efektivní umístění histonů a vytvoření nukleozomů na DNA (Nakagawa, Bulger et al. 2001).

Komplex hACF se pravděpodobně účastní různých biologických funkcí. Některé současné práce, jež využily metodu inkorporace tymidinového analogu BrdU (bromodeoxyuridinu) do DNA v buňkách HeLa naznačují, že komplex hACF je důležitý pro replikaci DNA pericentromerického heterochromatinu v pozdní S fázi buněčného cyklu (Collins, Poot et al. 2002). Další práce naznačují, že proteiny SMARCA5 a ACF1 mohou hrát přímou roli v transkripci cytokinových genů. U farmakologicky aktivované myší linie T buněčného lymfomu EL4 byla sledována hladina mRNA některých vybraných cytokinů a to před a po transfekci shRNA SMARCA5. Výsledky kvantitativní RT-PCR naznačují, že po snížení intracelulární hladiny proteinu Smarca5 za pomoci shRNA, došlo k navýšení hladin mRNA interleukinu-2, IL-17A, IL-5 a IL-13. Za těchto podmínek naopak došlo ke snížení hladiny mRNA cytokinu IL-3, což naznačuje, že protein SMARCA5 může mít represivní i aktivační vliv na transkripci (Precht, Wurster et al. 2010). Autoři studie provedli dále analýzu chromatinu těchto buněk metodou ChIP a zjistili, že hladina nabohacení proteinů SMARCA5 a ACF1 ve studovaných místech genových oblastí cytokinů byla oproti kontrole výrazně nižší. Vzhledem k tomu, že byly proteiny SMARCA5 a ACF1 přítomny ve studovaných oblastech cytokinových genů, autoři usuzují, že by mohli mít přímý vliv na regulaci transkripce (Precht, Wurster et al. 2010). Tyto studované oblasti obsahovaly restriční místa pro enzym DNázaI. Po provedení měření senzitivity těchto míst ke štěpení nukleázou, bylo zjištěno, že chromatin v případě promotoru IL-2 je po transfekci shRNA SMARCA5 více rozvolněný a v případě IL-3 méně rozvolněný, což koreluje i s transkripční aktivitou těchto cytokinových genů (Precht, Wurster et al. 2010). Další práce ukazují, že komplex hACF je schopen aktivovat transkripci *in vitro* (LeRoy, Loyola et al. 2000).

6.4.2 RSF

Chromatin remodelační komplex RSF (remodeling and spacing factor) se skládá z proteinu SMARCA5 a 325 kDa velkého proteinu Rsf-1. Komplex RSF byl poprvé purifikován z frakce jaderného extraktu buněk HeLa (LeRoy, Orphanides et al. 1998). *In vitro* analýza toho purifikovaného faktoru ukázala, že je komplex RSF schopen v přítomnosti ATP pohybovat histonovými oktamerem podél vlákna DNA a vytvořit tak pravidelně uspořádanou řadu nukleozomů (LeRoy, Orphanides et al. 1998). Dále byl testován vliv komplexu RSF na transkripci chromatinizované DNA za pomoci minimálního transkripčního systému s RNA polymerázou II. Tento transkripční systém není schopen aktivity, pokud je DNA sbalena do chromatinové struktury (Owen-Hughes and Workman 1994). Jestliže byl

k tomuto systému přidán purifikovaný komplex RSF společně s ATP, došlo k rozvolnění struktury chromatinu na DNA v oblasti promotoru a vytvoření funkčního transkripčně-iniciačního komplexu RNA polymerázy II (LeRoy, Orphanides et al. 1998). Další práce naznačují, že komplex RSF je schopen sestavit chromatinovou strukturu *in vitro* na linearizované i cirkulární DNA s nadobrátkami. Tato chromatinová struktura se vyznačuje pravidelnými rozestupy mezi nukleozómy a k jejímu vytvoření vyžaduje komplex RSF energii hydrolýzy ATP (Loyola, LeRoy et al. 2001). Mechanismus sestavení chromatinové struktury komplexem RSF je zřejmě odlišný od jiných remodelačních komplexů například již zmiňovaného komplexu dACF. Některé práce totiž ukazují, že tato aktivita komplexu RSF nevyžaduje přítomnost histonových chaperonů (Loyola, LeRoy et al. 2001). Zdá se že, funkci histonového chaperonu v tomto komplexu zajišťuje protein Rsf-1 (Loyola, Huang et al. 2003).

6.4.3 WICH

Chromatin remodelační komplex WICH je tvořen dvěma podjednotkami – proteinem SMARCA5 a přibližně 170 kDa velkým a u savců vysoce evolučně konzervovaným proteinem WSTF. Komplex WICH dokáže pohybovat nukleozómy na vlákne DNA. *In vitro* analýzy myšního komplexu WICH ukazují, že tento komplex katalyzuje v přítomnosti ATP pravidelné uspořádání nukleozomů na plazmidové DNA s uměle vytvořenou chromatinovou strukturou (Bozhenok, Wade et al. 2002). Komplex WICH pravděpodobně hraje roli v replikaci DNA. Některé současné studie, ve kterých jejich autoři použili metody nepřímé imunofluorescence a inkorporace BrdU na buňkách HeLa, ukazují, že protein WSTF je lokalizován v průběhu střední, pozdní a velmi pozdní S-fáze buněčného cyklu v oblastech probíhající replikace DNA (Poot, Bozhenok et al. 2004). Autoři dále ukazují, že protein WSTF v komplexu s proteinem SMARCA5 je přinášěn do těchto míst probíhající replikace po specifickém navázání s proteinem PCNA (Proliferating cell nuclear antigen). Pravděpodobně má komplex WICH v interakci s PCNA vliv na udržení otevřené struktury chromatinu krátce po replikaci, protože nově vytvořený chromatin (vytvořený méně než 10 min po replikaci DNA) je méně dostupný pro digesci DNázou I u buněk HeLa s uměle sníženou intracelulární hladinou proteinu WSTF, než u buněk kontrolních (Poot, Bozhenok et al. 2004). Bylo ukázáno, že buňky HeLa se sníženou hladinou proteinu WSTF za pomoci RNAi, mají také obtížněji štěpitelnou celkovou DNA oproti kontrole a zároveň je u nich detekovatelné zvýšení specifických heterochromatinových histonových modifikací (např. H3K9Me3, H3K27Me2) a proteinu HP1 (Poot, Bozhenok et al. 2004). Pozorování naznačují,

že může v těchto buňkách docházet k vytvoření heterochromatinu v globálním měřítku. Dalším následkem deplece proteinu WSTF je snížená celková transkripční aktivita buněk (Poot, Bozhenok et al. 2005).

Komplex WICH může hrát roli v regulaci transkripce některých genů přepisovaných RNA polymerázou III. Současné studie, které se zabývají analýzou jaderného extraktu buněk HeLa, ukazují, že proteiny SMARCA5 a WSTF mohou tvořit společně s dalšími jadernými proteiny [například Myb-bp1a (Myb-binding protein 1a); Sf3b/SAP155; RNA helikáza II/Guα; protoonkogen Dek; CSB (Cockayne syndrome protein B); NM1 (nuclear myosin 1)] komplex o velké molekulární hmotnosti (2-3 MDa) tzv. B-WICH (Cavellan, Asp et al. 2006). Analýzy jaderného extraktu buněk HeLa, jenž byly před sklizením inkubovány s transkripčním inhibitorem actinomycinem D, naznačují, že vznik komplexu B-WICH je zcela závislý na aktivní transkripci (Cavellan, Asp et al. 2006). Autoři této práce purifikovali společně s proteiny komplexu B-WICH také dva transkripty RNA polymerázy III – 5 S rRNA a 7SL RNA, což je vedlo k přesvědčení, že k sestavení komplexu dochází při transkripci genů přepisovaných RNA polymerázou III. Byla provedena chromatinová imunoprecipitace, která potvrdila asociaci proteinů komplexu B-WICH (SMARCA5, WSTF a NM1) s geny 5 S rRNA a 7SL RNA. Roli těchto proteinů v transkripci RNA polymerázy III podporuje i fakt, že buňky HeLa s depletovaným proteinem WSTF mají specificky sníženou intracelulární hladinu 5 S rRNA a 7SL RNA (Cavellan, Asp et al. 2006). V komplexu B-WICH tak pravděpodobně proteiny SMARCA5 a WSTF představují další frakci molekul vedle té, jenž plní funkci v replikaci DNA (Poot, Bozhenok et al. 2004).

Současné studie naznačují, že komplex WICH má funkci v transkripci ribozomálních genů (rDNA) přepisovaných RNA polymerázou I (Percipalle, Fomproix et al. 2006). Autoři této práce ukázali, že proteiny SMARCA5, WSTF a NM1, jenž byl za pomoci imunofluorescenčních technik detekován v kolokalizaci s RNA polymerázou I, spolu fyzicky interagují a jsou přítomny ve velkém multiproteinovém komplexu B-WICH (Percipalle, Fomproix et al. 2006). Pomocí imunoprecipitace a ChIP buněčných lyzátů tito autoři podpořili svoji hypotézu, že proteinový komplex SMARCA5-WSTF-NM1 je zapojen do transkripce genů přepisovaných RNA polymerázou I. Zjistili totiž, že komplex SMARCA5-WSTF-NM1 asociuje s RNA polymerázou I a je přítomen v promotorové a kódující oblasti rDNA. Autoři zmiňované studie dále inkubovali frakci jaderného extraktu (frakce DEAE-280) s protilátkami proti proteinu WSTF a zjistili, že dochází k inhibici transkripce RNA polymerázy I na chromatinizovaném DNA templátu oproti kontrole („holý“ DNA templát) (Percipalle, Fomproix et al. 2006). Popsaná pozorování naznačují, že komplex SMARCA5-

WSTF-NM1 pravděpodobně usnadňuje transkripčnímu aparátu RNA polymerázy I transkripci genů v chromatinové struktuře. Funkce komplexu SMARCA5-WSTF-NM1 v transkripci RNA polymerázy I byla dále potvrzena depletováním proteinu WSTF v buňkách HeLa, protože tyto buňky měly vůči kontrole až o 39% nižší intracelulární hladinu 45S pre-rRNA (Percipalle, Fomproix et al. 2006).

6.4.4 NoRC

Komplex NoRC je tvořen dvěma podjednotkami – proteinem SMARCA5 a 205 kDa velkým proteinem TIP5 (TTF-1 interacting protein 5). *In vitro* studie ukazují, že NoRC je chromatin remodelační komplex, který dokáže pohybovat nukleozómy na templátové DNA. Popsaná remodelační aktivita komplexu NoRC závisí na ATP a nestrukturovaném N-konci histonu H4 (Strohner, Nemeth et al. 2001). Další studie ukazují, že komplex NoRC specificky inhibuje transkripci rDNA z *in vitro* chromatinizovaného templátu (Strohner, Nemeth et al. 2004). Současné práce ukazují, že zvýšená intracelulární hladina velké podjednotky komplexu NoRC (protein Tip5) v buňkách myších fibroblastů reprimuje transkripci rDNA vneseného reportéru *in vivo* (Santoro, Li et al. 2002). Pravděpodobně je tato represe závislá na deacetylaci histonů a methylaci DNA, protože pokud byly buňky s nadprodukovaným proteinem Tip5 před sklizením ošetřeny inhibitorem DNA methyláz (5-azacytidin) nebo inhibitorem histonových deacetyláz (trichostatin A), k represí transkripce exogenní rDNA nedošlo (Santoro, Li et al. 2002; Zhou, Santoro et al. 2002). Další práce naznačují, že NoRC může zprostředkovávat deacetylační aktivitu histonů prostřednictvím komplexu SIN3 (Zhou, Santoro et al. 2002). SIN3 je jeden z hlavních korepresorových komplexů u savců, jenž obsahuje histonové deacetylázy HDAC1 a HDAC2 a tito autoři pomocí imunoprecipitace frakce jaderného extraktu (frakce DEAE-280) ukázali, že oba zmiňované proteinové komplexy spolu fyzicky interagují. Zdá se, že chromatin remodelační komplex NoRC asociuje s tímto korepresorovým komplexem skrze protein TIP5 (Zhou, Santoro et al. 2002). Protein TIP5 obsahuje ve své molekule několik inteakčních motivů, které jsou pravděpodobně důležité pro funkce komplexu NoRC jako například tandem domény PHD a bromodomény, jenž byl ukázán, že interaguje s deacetylázou HDAC1 (Zhou, Santoro et al. 2002), s proteinem SMARCA5 a histonovými methyltransferázami (Zhou and Grummt 2005); dále oblast aminokyselin (pozice 332-723 od N-konce molekuly), která je schopna interagovat s DNA methylázou Dnmt1 (Santoro, Li et al. 2002); doména TAM vázající RNA transkript intergenových sekvencí rDNA (Mayer, Schmitz et al. 2006). Studie, jejichž autoři použili

různé deleční mutanty proteinu TIP5, ukazují, že je tento protein důležitý také pro cílení komplexu NoRC na rDNA. Protein TIP5 v chromatin remodelačním komplexu NoRC rozeznává transkripční terminační faktor RNA polymerázy I (TTF-1), který je specificky vázán do regulační oblasti rDNA známé jako T₀ element (Strohner, Nemeth et al. 2004). Popsané výsledky naznačují, že komplex NoRC „umlčuje“ geny ribozomálních RNA a to tím, že přináší různé enzymatické aktivity do promotorové oblasti těchto genů.

Studie autorů (Li, Langst et al. 2006) naznačuje, že komplex NoRC ovlivňuje mobilitu nukleozomů v oblasti promotoru rDNA tak, že jsou tyto nukleozómy umístěny do pozic, které nejsou výhodné pro vznik transkripčního komplexu. Tito autoři ukázali, že nukleozómy vázané v promotoru potenciálně aktivních genů ribozomální RNA okupují oblast nukleotidů v pozicích -157 až -2 proti proudu od transkripčního startu. Nukleozómy umlčených genů pak pokrývají nukleotidovou sekvenci od pozice -132 po pozici +22. U buněk myších fibroblastů byl detekován poměr nukleozomů v „aktivní“ pozici vůči nukleozomům v „umlčující“ pozici 1:1, ale po zvýšení intracelulární hladiny chromatin remodelačního komplexu NoRC respektive proteinu TIP5 se tento poměr změnil na přibližně 1:5. Pokud byl v buňkách myších fibroblastů nadprodukován mutovaný protein TIP5/Y1175F, což je mutanta, jenž neasociuje s chromatinem, nevytváří heterochromatinovou strukturu a nezpůsobuje represi transkripce rDNA (Zhou and Grummt 2005), ke změně poměru nukleozomů v „aktivních“ a „umlčujících“ pozicích oproti kontrole (netransfekovaným buňkám) nedošlo. Tyto výsledky naznačují, že komplex NoRC je nejenom schopen přinést do oblasti promotoru rDNA enzymatické aktivity (např. DNA methylázy, proteiny modifikující histony), ale je také schopen v této oblasti aktivně měnit pozici nukleozomů, čímž se v konečném důsledku vytváří uzavřená transkripčně represivní heterochromatinová struktura.

7 Cíle diplomové práce

Role chromatin remodelačního faktoru SMARCA5 byla popsána v *in vitro* modelech a částečně v některých modelech *in vivo*, přesto je evidentní, že řada důležitých aspektů zůstává zatím nepopsána. Hlavním cílem této diplomové práce je studovat vliv manipulované hladiny SMARCA5 na vývoj chromatinové struktury uměle vneseného reportérového vektoru v eukaryotních buňkách. Cíl obsahuje následující části:

1. Vytvořit a optimalizovat buněčný model pro studium chromatin remodelačního faktoru SMARCA5
2. Objasnění chromatinových změn v podmínkách zvýšené exprese SMARCA5 v navrženém buněčném systému.

Tento cíl umožní sledovat funkci Smarca5 *in vivo* a na základě těchto výsledků umožní navrhnout experimenty na úrovni endogenního chromatinového značně komplexního kontextu savčího genomu.

8 Materiály a metody

8.1 Materiály

8.1.1 Přístrojové vybavení

Analytické váhy ALJ 220-4 (KERN)
Centrifuga 5415 D (eppendorf)
Centrifuga 5415 R (eppendorf)
Centrifuga 5804 R (eppendorf)
Cykler Mastercycler gradient (eppendorf)
Cykler na kvantitativní PCR 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
Elektroforetický systém HE 33 Mini Submarine unit (Hoefer)
Fotoaparát Panasonic DMC-LS1
Hybridizátor (Techne)
Inkubátor s integrovanou třepačkou (GALLENKAMP)
Inkubátor tkáňových kultur Forma Direct Heat CO2 Incubator (Thermo Electron Corporation)
Laminární box Bio-II-A (TELSTAR)
Magnetický míchač Heating Magnetic Stirrer (Velp Scientifica)
Mikroskop Eclipse TS100 (Nikon)
Mikroskop T-DH (Nikon)
Parní sterilizátor (Sterilab)
Měřič pH/mV/Temp Meter PL-600 (EZDO)
Pipetboy accu-jet (Brand)
Sonikátor Digital sonifier 450 (BRANSON)
Spektrofotometr BioPhotometer (eppendorf)
Spektrofotometr ND-1000 (NanoDrop)
Stolní centrifuga spectrafuge mini (Labnet)
Termoblok AccuBlock digital dry bath (Labnet)
Termoblok Thermomixer comfort (eppendorf)
Termoblok Thermomixer compact (eppendorf)
Transformátor stejnosměrného proudu PowerPac Basic (Bio-Rad)
Transiluminátor T 2202 (Sigma)
Váhy 440-43N (KERN)
Vortex MS1 Minishaker (IKA)

8.1.2 Chemikálie

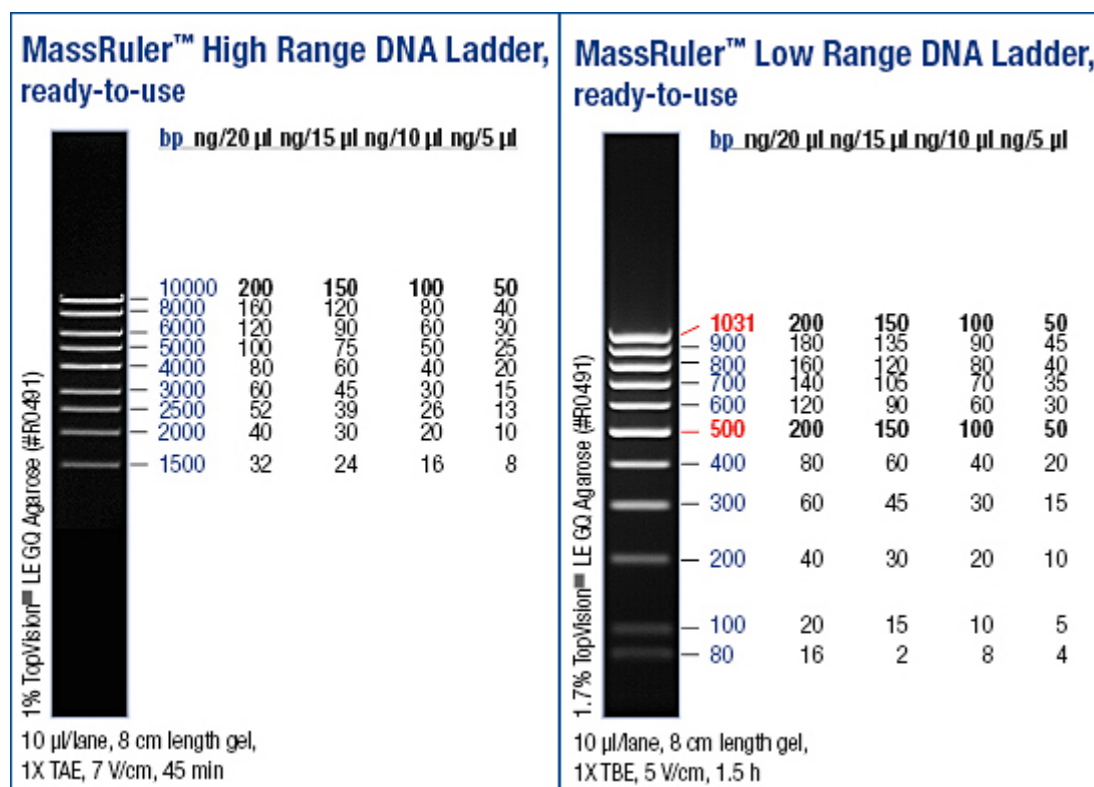
100 mM dNTP mix (Applied Biosystems)
100 mM roztoky nukleotidů dATP, dCTP, dTTP, dCTP (Segenetic)
20x SSC READY PACK (Amresco)
50 mM roztok MgCl₂ (Bio-Rad)
Acetát sodný trihydrát (Amresco)
Agarosa I (Amresco)
Agarosové kuličky s navázaným Proteinem A a Proteinem G (Sigma)
Ampicilin sodná sůl (Amresco)
Bovinní sérum albumin, BSA (Amresco)
Činidlo Bradfordové E530-11 (Amresco)

Dimethylsulfoxid, DMSO (Carl Roth a Sigma)
DNA polymeráza iTaq 5U/μl (Bio-Rad)
Dodecylsírán sodný, SDS (Amresco)
Dulbeccos Modified Eagle Medium, D-MEM s glukosou 1 g/L, L-glutaminem, pyruvátem (Gibco)
Ethidium bromid, EtBr (Amresco)
Fenol (Sigma)
Fetální bovinní sérum, FBS (Gibco)
Formaldehyd 37% (Electron Microscopy Sciences)
Fosfátový pufr, PBS (Amresco)
Fosfátový pufr, 10x PBS pH = 7.4 bez CaCl₂ a MgCl₂ (Gibco)
Glycerol (Amresco)
Glycin (Amresco)
Hybridizační membrána Hybond-N (Amersham)
Hybridizační pufr PerfectHyb Plus (Sigma)
Hydroxid draselný (Penta)
Hydroxid sodný (Amresco)
Chlorid sodný (Amresco)
Chlorid vápenatý - roztok 1M (Amresco)
Igepal CA-630 (Sigma)
Isopropanol (Scharlau Chemie)
Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová, HEPES (Sigma)
Kyselina boritá (Riedel-de Haen)
Kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Riedel-de Haen)
Kyselina ethylenglykol tetraoctová, EGTA (Amresco)
Kyselina chlorovodíková (Amresco)
LB Agar (Sigma)
LB Broth (Sigma)
Lipofectamine 2000 (Invitrogen)
Mikro UV-kyvety 70 μl (Brand)
Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco)
Penicillin/Streptomycin (Biochrom)
Power SYBR Green PCR Master mix 2x (Applied Biosystems)
Proteázové inhibitory P8340-1ml (Sigma)
Proteináza K (Amresco)
Pufr pro iTaq polymerázu 10x koncentrovaný (Bio-Rad)
Rentgenové filmy (Kodak)
Restrikční endonukleázy (Fermentas)
Roztok 6x MassRuler Loading Dye (Fermentas)
Sephadex G-50 (Sigma)
Síran měďnatý (Penta)
SOC medium (Invitrogen)
Tergitol, type NP-40 (Sigma)
Trichlormethan (Riedel-de Haen)
Trizma base - tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma)

Standardy molekulových hmotností (Fermentas) pro:

-velké fragmenty DNA (10-1,5 kbp)

-malé fragmenty DNA (1000-80 bp)



8.1.3 Protilátky

V pokusech byly použity protilátky z následujících komerčních zdrojů:

Abcam

Název protilátky	Původ, klonalita	Katalogové číslo
KDM5A/Jarid1A/RBBP2 - ChIP Grade	králíčí polyklonální	ab45301
KDM5B/PLU1/Jarid1B - ChIP Grade	králíčí polyklonální	ab50958
Histone H3 (tri methyl K4) - ChIP Grade	králíčí polyklonální	ab8580
Histone H3 - ChIP Grade	králíčí polyklonální	ab1791
SNF2H - ChIP Grade	králíčí polyklonální	ab3749

Calbiochem

Název protilátky	Původ, klonalita	Katalogové číslo
Normal Rabbit IgG	nativní IgG králíčího séra	NI01

8.1.4 Roztoky

8.1.4.1 Zásobní roztoky

Všechny zásobní roztoky byly skladovány při pokojové teplotě.

0,2 M EGTA (pH=8)

7,607 g EGTA bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O, pH bylo upraveno nasyceným roztokem NaOH a roztok doplněn vodou do 100 ml

0,5 M EDTA (pH=8)

73,06 g EDTA bylo rozpouštěno ve 400 ml ddH₂O, za stálého míchání byly přidávány pecičky NaOH do doby, než roztok dosáhl pH=8 (EDTA je při pH nižším než 8 ve vodě nerozpustná). Po kompletním rozpuštění EDTA byl roztok doplněn vodou do 500 ml, přefiltrován (filtr s propustností 300 µm) a sterilizován v autoklávu.

1 M HEPES – KOH (pH=7,5)

23,83 g HEPES bylo rozpuštěno v 80 ml sterilní ddH₂O, pH bylo upraveno nasyceným roztokem KOH a roztok doplněn vodou do 100 ml

1 M Tris-HCl (pH=8)

30,285 g Trizma base bylo rozpuštěno ve 200 ml ddH₂O, pH bylo upraveno pomocí 37% HCl a roztok doplněn vodou do 250 ml

1 M KCl

7,455 g KCl bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 100 ml

2,5 M glycin

7,507 g glycinu bylo rozpuštěno ve 30 ml ddH₂O a roztok byl doplněn vodou do 40 ml

5 M NaCl

73,05 g NaCl bylo rozpuštěno ve 200 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 250 ml.

10% SDS

40 g SDS bylo rozpuštěno ve 300 ml ddH₂O a roztok doplněn vodou do 400 ml, nesterilizováno v autoklávu

70% ethanol

36,458 ml 96% EtOH bylo za stálého míchání ředěno sterilizovanou ddH₂O do výsledného objemu 50 ml

3M acetát sodný

40,824 g NaAc*3H₂O bylo rozpuštěno v 80 ml ddH₂O a poté byl roztok doplněn vodou do 100 ml

1000x EtBr

0,5 mg EtBr bylo rozpuštěno v 1 ml ddH₂O

8.1.4.2 Pufry a preparační roztoky

Teploty, při kterých byly jednotlivé roztoky skladovány, jsou uvedeny v závorkách.

RT – označuje pokojovou teplotu

PI – označuje přítomnost proteázových inhibitorů v roztoku; ředění PI bylo provedeno v poměru 1:1000

11% roztok formaldehydu (4 °C)		výsledná koncentrace
37% formaldehyd	74.5 ml	11%
5 M NaCl	5 ml	100 mM
0.5 M EDTA (pH=8)	0,5 ml	1 mM
0.2 M EGTA (pH=8)	0,625 ml	0.5 mM
1 M HEPES-KOH (pH=8)	12.5 ml	50 mM
ddH ₂ O	156.9 ml	celkem: 250 ml

Lyzační pufr I (4°C; PI)		výsledná koncentrace
1 M HEPES-KOH (pH=7.5)	5 ml	50 mM
5 M NaCl	2.8 ml	140 mM
0.5 M EDTA	0.2 ml	1 mM
100% glycerol	10 ml	10%
10% NP-40	5 ml	0.5%
Triton X-100	0.25 ml	0.25%
ddH ₂ O	76.75 ml	celkem: 100 ml

Lyzační pufr II (4°C; PI)		výsledná koncentrace
0.5 M EDTA (pH=8)	0.2 ml	1 mM
0.2 M EGTA (pH=8)	0.25 ml	0.5 mM
1 M Tris-HCl (pH=8)	1 ml	10 mM
5 M NaCl	4 ml	200 mM
ddH ₂ O	94.55 ml	celkem: 100 ml

Lyzační pufr III (4°C; PI)		výsledná koncentrace
0.5M EDTA (pH=8)	0.2 ml	1 mM
0.2M EGTA (pH=8)	0.25 ml	0.5 mM
1M Tris-HCl (pH=8)	1 ml	10 mM
ddH ₂ O	98.55 ml	celkem: 100 ml

Imunoprecipitační pufr (4°C; PI)		výsledná koncentrace
10% SDS	1 ml	0.02%
Trion X-100	10 ml	2%
0.5 M EDTA	4 ml	4 mM
1 M Tris-HCl (pH=8)	20 ml	40 mM
5 M NaCl	30 ml	300 mM
ddH ₂ O	435 ml	celkem: 500 ml

Promývací pufr I (4°C; PI)		výsledná koncentrace
10% SDS	5 ml	0.1%
Triton X-10	5 ml	1%
0.5 M EDTA (pH=8)	2 ml	2 mM
1 M Tris-HCl (pH=8)	10 ml	20 mM
5 M NaCl	15 ml	50 mM
ddH ₂ O	463ml	celkem: 500 ml

Promývací pufr II (4°C; PI)		výsledná koncentrace
10% SDS	5 ml	0.1%
100% Triton X-10	5 ml	1%
0.5 M EDTA (pH=8)	2 ml	1%
1 M Tris-HCl (pH=8)	10 ml	20 mM
5 M NaCl	50 ml	500 mM
ddH ₂ O	428 ml	celkem: 500 ml

Pufr proteinázy K (RT)		výsledná koncentrace
10% SDS	12.5 ml	0.5%
0.5 M EDTA (pH=8)	12.5 ml	25 mM
1 M Tris-HCl (pH=8)	2.5 ml	10 mM
5 M NaCl	5 ml	100 mM
ddH ₂ O	217.5 ml	celkem: 250 ml

1x Pufr pro digesci MNázou (4°C)		výsledná koncentrace
sacharóza	3,423 g	250 mM
1 M DTT	20 µl	0,5 mM
1 M KCl	2400 µl	60 mM
5 M NaCl	120 µl	15 mM
1M Tris-HCl (pH=7,5)	600 µl	15 mM
1M CaCl ₂	40 µl	1 mM
ddH ₂ O	doplněno do 40 ml	celkem: 40 ml

Neutralizovaný fenol (4°C) celkem: 20 ml
 Bylo smícháno 20 ml fenolu s 20 ml 100 mM Tris-HCl (pH=7,5) a důkladně protřepáno. Po rozdělení tekutin byla spodní, organická fáze, neutralizovaný fenol.

Denaturační roztok (RT)		výsledná koncentrace
NaOH	8 g	0,5 M
NaCl	35,064 g	1,5 M
ddH ₂ O	doplněno do 400 ml	celkem: 400 ml

Neutralizační roztok (RT)		výsledná koncentrace
Trizma base	24,228 g	0,5 M
NaCl	35,064 g	1,5 M
37% HCl	navážky rozpuštěny v 350 ml vody a roztok upraven na pH=7	
ddH ₂ O	doplněno do 400 ml a vysterilizováno	celkem: 400 ml

20x SSC (sodium chloride/sodium citrate) (RT)		výsledná koncentrace
NaCl	175,32 g	3,0 M
Na ₃ citrate*2H ₂ O	88 g	0,3 M
37% HCl	navážky rozpuštěny v 950 ml vody a roztok upraven na pH=7	
ddH ₂ O	doplněno do 1 L a vysterylizováno	celkem: 1000 ml

Pufr TE (RT)		výsledná koncentrace
1 M Tris-HCl (pH=7,5)	1 ml	10 mM
0,5 M EDTA (pH=8)	0,2ml	1 mM
ddH ₂ O	doplněno do 100ml a vysterylizováno	celkem: 100 ml

Pufr CSK (cytoskeleton) (4°C)		výsledná koncentrace
Triton X-100	200 µl	0,5%
5 M NaCl	800 µl	100 mM
0,2 M EGTA	200 µl	1 mM
1 M MgCl ₂	120 µl	3 mM
sacharóza	4,1076 g	300 mM
1 M HEPES-KOH (pH=6,9)	400 µl	10 mM
ddH ₂ O	doplněno do 40 ml	celkem: 40 ml

10x Pufr TBE (Tris – borátový) (RT)		výsledná koncentrace
Trizma base	107,8146 g	890 mM
H ₃ BO ₃	55,0287 g	890 mM
0,5 M EDTA (pH=8)	40 ml	20 mM
ddH ₂ O	doplněno do 1000 ml a vysterylizováno	celkem: 1000 ml

8.1.4.3 Roztoky pro práci s bakteriemi a tkáňovými kulturami

Všechny uvedené roztoky byly skladovány ve 4 °C.

Tkáňová voda

Připravována sterilizací ddH₂O v autoklávu Sterilab 20 min, 121 °C.

D-MEM (89% D-MEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin)

Do 50 ml zkumavky Falcon bylo pipetováno 45 ml D-MEM, 5 ml FBS a 500 µl Penicillin/Streptomycin (Biochrom). Výsledná koncentrace antibiotik v mediu odpovídá 100 U/ml a 100 µg/ml.

1x PBS

50 ml 10x PBS (Gibco) naředěno ve sterilních podmínkách 450 ml tkáňové vody

Zamrazovací roztok pro buněčné linie (70% D-MEM, 20% FBS, 10% DMSO)

Zamrazovací médium bylo připravováno do 15 ml zkumavky Falcon. Pipetovalo se 10,5 ml D-MEM, 3 ml FBS a 1,5 ml DMSO (Carl Roth)

LB médium

8 g práškového LB Broth bylo rozpuštěno ve 400 ml ddH₂O a výsledný roztok byl autoklávován. Po sterilizaci a vychladnutí bylo do tohoto roztoku přidáno antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace ampicilinu 100 µg/ml).

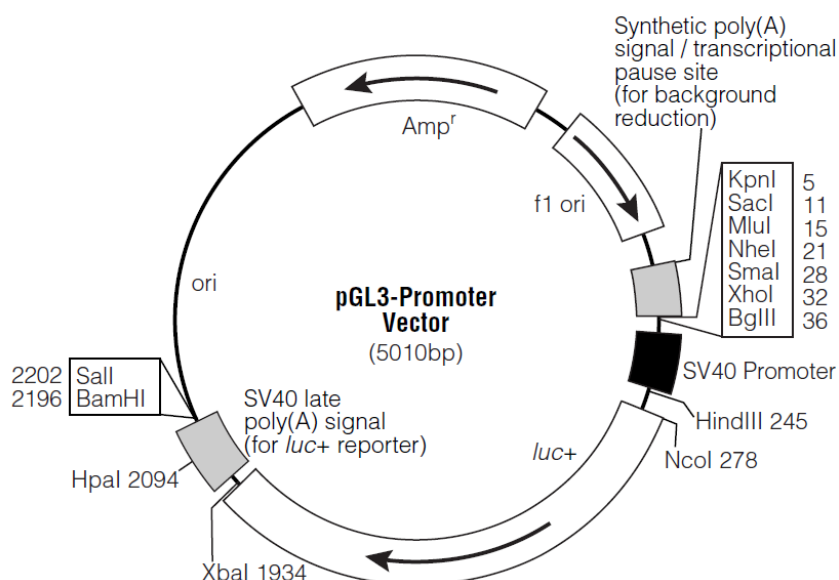
Živný agar

14 g práškového LB Agar bylo rozpuštěno ve 400 ml ddH₂O a výsledný roztok byl autoklávován. Po sterilizaci byl tento roztok ochlazen na 55 °C a bylo do něj rozpuštěno antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace ampicilinu 100 µg/ml). Do předem připravených Petriho misek bylo pipetováno 12 ml roztoku živného agaru. Po zatuhnutí agaru byly misky přeneseny do 4 °C.

8.1.5 Vektory

pGL3 promoter (Promega)

Ideální pro kvantitativní analýzu faktorů, které mohou potenciálně ovlivňovat expresi genů v savčích buňkách. Vektor pGL3 promoter obsahuje modifikovanou kódující oblast genu luciferázy, která nám umožnila sledovat transkripční aktivitu tohoto vektoru. Gen luciferázy je pod kontrolou silného promotoru (SV40). Tento promotor způsobuje vysokou bazální transkripci genu luciferázy v savčích buňkách a díky tomu můžeme velice senzitivně sledovat vliv trans-aktivátorů (např. DNA vazebných proteinů) na expresi.

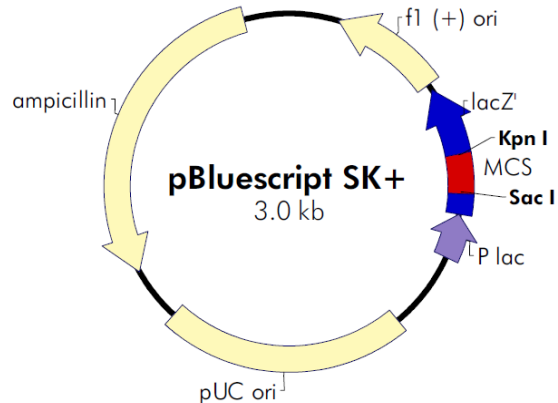


Zdroj: <http://www.promega.com>

pBluescript SK+ (Stratagene)

Vektor pBluescript SK+ byl použit jako tzv. vyvažovací plasmid, tedy pro doplnění do celkové koncentrace DNA vkládané do buněk. V eukaryotních buňkách nedochází k jeho expresi a nezatěžuje tak jejich transkripční aparát.

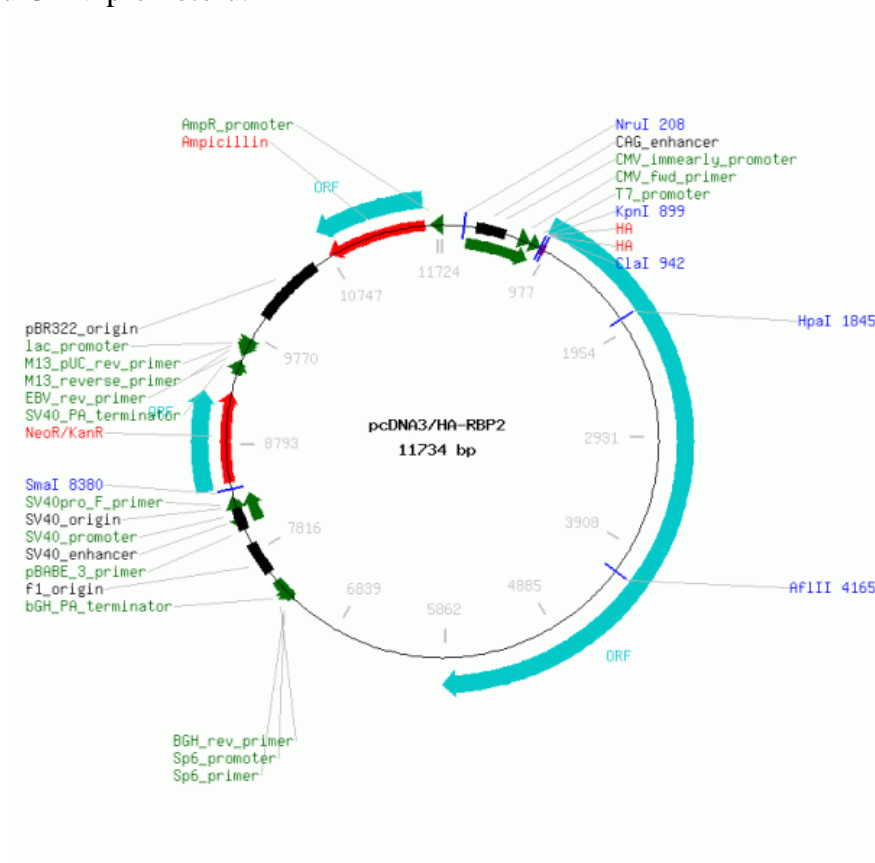
f1 (+) origin 138–444
β-galactosidase α-fragment 463–816
multiple cloning site 653–760
lac promoter 817–938
pUC origin 1158–1825
ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833



Zdroj: <http://www.genomex.com>

pcDNA3-HA-RBP2 (dar od Elizavety Benevolenskaya, Ph.D.)

Vektor pcDNA3 je určen pro vysokou stabilní expresi do něj vložených genů v savčích buňkách. Vektor pcDNA3-HA-RBP2 (Benevolenskaya, Murray et al. 2005) nese gen kódující velkou isoformu proteinu RBP2 (obsahuje všechny tři PHD domény), která je pod kontrolou CMV promotoru.



Zdroj: <http://www.lablife.org>

pcDNA4/TO-PLU1 (dar od Debbie Hall)

Tento plasmid obsahuje celou cDNA proteinu PLU1/JARID1B a umožňuje její vysokou expresi v savčích buňkách. pcDNA4/TO-PLU1 byl vytvořen vyštěpením cDNA proteinu PLU1/JARID1B z vektoru PLU-1pBS-SK(-) (Lu, Sundquist et al. 1999) pomocí restričních endonukleáz. Vzniklý BamHI-XhoI fragment byl následně zaligován do vektoru pcDNA4/TO ze systému T-REx od firmy Invitrogen (Scibetta, Santangelo et al. 2007).

pcDNA4/TO-SMARCA5

Vektor pcDNA4/TO-SMARCA5 byl vytvořen Dr. T. Stopkou, který překlonoval cDNA proteinu SMARCA5 (Aihara, Miyoshi et al. 1998) do plazmidu pcDNA4/TO. Tato cDNA proteinu SMARCA5 obsahuje na svém 3' konci (těsně před stop kodónem) oblast kódující FLAG epitop a byla získána restričním štěpením plazmidu pFastBac1 (Aalfs, Narlikar et al. 2001) endonukleázami BamHI a XbaI. Vektor pFastBac1 je darem od Geety J. Narlikar.

8.1.6 Primery

Primery byly objednány k syntéze u firem Invitrogen a Integrated DNA Technologies. Jednotlivé lyofilizované oligonukleotidové řetězce primerů byly rozpouštěny 30 min ve sterilní ddH₂O při teplotě 55 °C na výslednou koncentraci 200 µM. Poté byly zamrazeny a skladovány v -80 °C.

Sekvence primeru	Označení	Velikost [bp]	Teplota tání v 50 mM NaCl [°C]
TATGAAACGATATGGGCTGAATAC	LUC-F1	24	53
GAGATTCTCGCATGCCAGAGATCC	LUC-F2	24	59,2
CATACTGTTGAGCAATTCACGTTC	LUC-R1	24	55,3
CTGAAGGCTCCTCAGAAACAGCTC	LUC-R2	24	59,2
CATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACC	LUC-F3	26	59,4
GTAAGTGATGTCCACCTCGATATGTGC	LUC-R3	27	59,5
AGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACC	LUC-F4	24	60,8
CCTGGTAATCCGTTTTAGAAATCCATG	LUC-R4	26	56,3
ACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCC	LUC-F5	26	60,2
TTAGGCAGACCAGTAGATCCAGAGG	LUC-R5	25	59
CTGCTGGTGCCAACCCTATTCTC	LUC-F6	23	59,5
TGGAACCTCTTGGCAACCGCTTC	LUC-R6	23	61,7
ATGGGCTCACTGAGACTACATCAGC	LUC-F7	25	60
TATCCAGATCCACAACCTTCGCTTC	LUC-R7	25	58,8
AACGCCTTGATTGACAAGGATGGATG	LUC-F8	26	60
TTAATCAGAGACTTCAGGCGGTCAAC	LUC-R8	26	59
CAACATCTTCGACGCAGGTGTCG	LUC-F9	23	60,8

TCCGTCATCGTCTTTCCGTGCTC	LUC-R9	23	61,3
TGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTAC	LUC-F10	25	58,7
TAGAATTACACGGCGATCTTTCCGC	LUC-R10	25	59,4
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCC	SV40-F1(2)	28	57,1
AAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGC	SV40-R1(2)	27	59,6
TCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAG	SV40-F2	27	61
TACCAACAGTACCGGAATGCCAAGC	SV40-R2	25	61,2
AAATAGGCTGTCCCCAGTGCAAGTG	preSV40-F0	25	61,3
GACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGC	preSV40-R0	28	57,5

8.1.7 Organismy

DH5 α (Invitrogen)

Kompetentní bakteriální buňky (kmen *E. coli*), které jsou vhodné pro běžné klonování do plasmidových vektorů. Nehodí se pro tvorbu knihoven cDNA. Obsahují delecí *lacZ* Δ M15 umožňující α -komplementaci tohoto genu, který kóduje β -galaktosidázu. Díky tomu může být detekováno modré/bílé zbarvení kolonií pěstovaných na misce v přítomnosti X-gal nebo Bluo-gal. DH5 α také podporují replikaci vektorů M13mp.

Genotyp: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U196 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ ⁻

HeLa (American type culture collection, ATCC)

Buňky HeLa jsou lidskou nádorovou buněčnou linií odvozenou od karcinomu děložního čípku. Tyto buňky jsou epiteliálního původu a adherují (přisedají) k podkladu kultivační lahve. HeLa buňky jsou dobře kultivovatelné a velice účinně se dají transfekovat lipofekčním činidlem Lipofectamine 2000. Buňky HeLa jsou velice často využívány, mimo jiné v pokusech, které jsou zaměřeny na studium vlivu transkripčních faktorů na transkripci. Proto tyto buňky byly vybrány pro náš systém, který umožňuje sledování vlivu proteinu SMARCA5 na transkripci vneseného DNA templátu.

8.2 Metody

8.2.1 Práce s tkáňovými kulturami

Veškeré roztoky a média použité při práci s tkáňovými kulturami byly dočasně skladovány v + 4 °C a před samotnou prací vytemperovány na 37 °C.

Rozmražení buněk

Kryozkumavka se zamraženou buněčnou kulturou byla přenesena do vodní lázně (37 °C), kde byla držena do doby, než se všechn led v ní nerozpustil. Po rozehrátí byla buněčná suspenze okamžitě přepipetována do 9 ml čerstvého média D-MEM (+FBS, +P/S) a stočena v 15 ml centrifugační zkumavce 5 min, 300 g při 4 °C. Buňky byly následně rozsuspendovány v 6 ml čerstvého média D-MEM (+FBS, +P/S), přeneseny do kultivační lahve s obsahem dna 25 cm² a uloženy v inkubátoru.

Kultivace buněk

Buňky HeLa byly kultivovány v médiu D-MEM (+FBS, +P/S) v inkubátoru, který udržoval stálou teplotu 37 °C a koncentraci plynného CO₂ 5%.

Pasážování buněk

Poté co buňky HeLa narostly do požadovaného množství nebo pokrývaly 99% plochy dna kultivační lahve, byly pasážovány. Pasážování probíhalo nejprve odstraněním veškerého původního média a promytím buněk roztokem fosfátového pufru PBS. Po odsátí PBS byl k buňkám přidán roztok trypsinu a kultivační lahev s nimi přenesena zpět do inkubátoru. V době, kdy se přibližně polovina buněk uvolnila od dna, bylo do lahve přidáno čerstvé medium D-MEM (+FBS, +P/S). Zbytek přisedlých buněk byl spláchnut pipetou a vzniklá buněčná suspenze umístěna do 15 ml centrifugační zkumavky a stočena 5 min, 300 g při 4 °C. Po stočení došlo k opětovnému rozsuspendování buněk v médiu a k jejich rozdělení do nových kultivačních lahví.

Zamrazování buněk

Byly zamrazovány buňky s maximálně 80-ti procentní konfluencí na kultivační lahvi a s co možná nejnižším počtem pasážovacích cyklů. Buňky byly nejprve sklizeny a stočeny v centrifuze 5 min, 300 g, 4 °C. Poté byly rozsuspendovány v zamrazovacím médiu (70% D-MEM, 20% FBS, 10% DMSO) na koncentraci 10⁶ buněk/ml a přemístěny do kryozkumavek. Kryozkumavky s buňkami byly vloženy do předem vychlazeného (-20 °C) mrazícího bločku s isopropanolem a v něm přeneseny do -80 °C.

Transfekce DNA do buněk

Transfekce probíhaly obvykle ve 12-ti nebo 6-ti jamkových destičkách za pomoci činidla Lipofectamine 2000. Den před transfekcí bylo na tyto destičky naseto 2x10⁵ (12-ti jamková) nebo 5x10⁵ (6-ti jamková) buněk. Buňky byly hodinu před transfekcí promyty v PBS a poté dostaly čerstvé médium bez antibiotik (90% D-MEM, 10%FBS). Další kroky byly provedeny podle pokynů výrobce transfekčního činidla Lipofectamine 2000. Šest hodin po

transfekci bylo k buňkám přidáno do dvojnásobného objemu čerstvé médium D-MEM (+FBS, +P/S), tak aby výsledná koncentrace FBS činila 15% a výsledná koncentrace antibiotik 0,5%.

8.2.2 Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)

Na imunoprecipitaci byl použit chromatin z transfekované buněčné linie HeLa. Transfekce byly standardně provedeny na 6-ti jamkových destičkách ve čtyřplikátech, což odpovídá přibližně dvěma milionům buněk. Buňky byly zpracovány 48 h po transfekci.

Fixace formaldehydem

Buňky byly nejprve sklizeny – promyty v PBS (1 ml/jamka), uvolněny roztokem trypsinu (200 μ l/jamka) a poté rozsuspendovány v čerstvém médiu D-MEM (+FBS, +P/S; 800 μ l/jamka). Shodné transfekce byly sloučeny do jedné 15 ml zkumavky a centrifugovány 5 min, 300 g, 4 °C. Po centrifugaci došlo k opětovnému rozsuspendování buněk v čerstvém médiu D-MEM (6 ml) a z každé 15 ml zkumavky bylo odebráno 450 μ l buněčné suspenze na luciferázovou analýzu (viz. dále). Do média k buňkám bylo přidáno 550 μ l čerstvě připraveného 11% roztoku formaldehydu (výsledná koncentrace roztoku formaldehydu 1%). Fixace byla ukončena po deseti minutách přidáním 315 μ l 2,5 M roztoku glycinu (výsledná koncentrace glycinu činila 0,125 M) a přenesením zkumavek na led. Inkubace na ledu probíhala 5 min, zkumavky byly následně stočeny 4 min, 1900 g, 4 °C a vzniklá peleta rozpuštěna v 7,5 ml předchlazeného pufru PBS. Po 30 min byly zkumavky znovu stočeny 3 min, 4000 g při 4 °C.

Izolace chromatinu

Veškeré manipulace se vzorky probíhaly vždy na ledu. Pelety buněk fixovaných formaldehydem byly rozsuspendovány v 5 ml Lyzačního pufru I a zkumavky byly stočeny 10 min, 4 000 g, 4 °C. Po stočení a odstranění supernatantu byl do každé ze zkumavek přidán Lyzační pufr II (5 ml). Vzorky byly inkubovány 10 min na ledu a po této době znovu centrifugovány 10 min, 4 000 g, 4 °C. Utvořené pelety byly rozsuspendovány ve 2 ml Lyzačního pufru III a následně sonikovány.

Fragmentace chromatinu pomocí sonikace

Sonikace byly provedeny na přístroji Digital sonifier 450 (BRANSON). Zkumavky se vzorkem chromatinu byly upevněny na ethanolem očištěnou jehlu sonikátoru. Jako chladicí lázeň byla použita směs ethanolu s vodou. Program sonikace tvořilo 500 dvouvteřinových pulzů, mezi nimiž byla 13 vteřinová prodleva. Amplituda byla nastavena na 45%, teplota pulzu 20 °C a maximální teplota pulzu 37 °C. Po ukončení programu byly rozsonikované buněčné lyzáty stočeny 15 min, 11 000 g, 4 °C a přeneseny do nových mikrocetřifugačních zkumavek. Vzorky byly poté zamrazeny nebo okamžitě použity na imunoprecipitaci.

Imunoprecipitace (IP)

Na začátku každé IP byly provedeny paralelně dvě reakce:

Vazba protilátek na agarosové kuličky

Na jednu IP bylo do mikrocentrifugační zkumavky pipetováno 5 μ l agarosových kuliček s navázaným Proteinem A, 5 μ l agarosových kuliček s navázaným Proteinem G a 90 μ l IP pufru. Po stočení (5 min, 5 000 g, 4 °C) byl ze zkumavky odsán supernatant a utvořená peleta byla rozpuštěna ve 100 μ l IP pufru. Do mikrocentrifugační zkumavky bylo následně přidáno 5 μ l roztoku BSA (100 mg/ml) a soustava byla třepána 2 h při 4 °C. Po uplynutí stanovené doby byl k agarosovým kuličkám připipetován 1 μ g protilátky a následovala další dvouhodinová inkubace soustavy při 4 °C.

Předčištění chromatinu

Na jeden vzorek chromatinu byla připravena následující suspenze – 10 μ l agarosových kuliček s navázaným Proteinem A, 10 μ l agarosových kuliček s navázaným Proteinem G a 100 μ l IP pufru. Suspenze byla po krátkém protřepání stočena (2 min, 2 000 g, 4 °C), rozsuspendována ve 30 μ l čerstvého IP pufru a přenesena do mikrocentrifugační zkumavky s rozsonikovaným chromatinem. Samotné předčištění probíhalo na třepačce 4 h při 4 °C. Následně byl předčištěný chromatin stočen 10 min, 10 000 g, 4 °C, přenesen do čisté zkumavky a byla stanovena jeho přibližná koncentrace DNA.

Ze změřené koncentrace DNA předčištěného chromatinu byl vypočten objem, ve kterém bylo 25 μ g DNA. Jedna desetina tohoto objemu byla odebrána do čisté zkumavky jako tzv. 10% input DNA. Zbýlá část přečištěného chromatinu (22,5 μ g) byla přidána k suspenzi agarosových kuliček s navázanou protilátkou. Tato směs agarosových kuliček s protilátkou a chromatinem byla následně doplněna IP pufrům do výsledného objemu 1 ml a třepána přes noc při 4 °C.

V další části pokusu byly vzorky přeneseny z třepačky a ponechány přibližně hodinu při laboratorní teplotě. Následovalo jejich stočení (6 min, 6 000 g, 4 °C), odebrání supernatantu a promytí pelet čerstvým IP pufrům (1 ml). Vzorky byly opět stočeny a obdobně promyty promývacími pufrými I a II. Po promytí byly pelety vzorků rozsuspendovány v pufru proteinázy K (100 μ l), který obsahoval 10 μ g proteinázy K a 1U RNasy. Tento pufr byl také nepipetován do zkumavek s dříve odebraným 10% inputem a to do výsledného objemu 1 ml. Zkumavky se vzorky a 10% inputy DNA byly inkubovány přes noc při 55 °C. Na poslední dvě hodiny byla teplota zvýšena na 65 °C. Poté byly zkumavky stočeny (5 min, 5 000 g, RT) a supernatant z nich přenesen do nových zkumavek. Ke vzorkům byla napipetována směs precipitující DNA – 2 μ l glykogenu, 10 μ l 3M acetátu sodného a 250 μ l 96% ethanolu. Stejným způsobem byla precipitována DNA i ze 100 μ l odebraných z 1 ml 10% inputu DNA. Tím byl získán 1% input DNA. Zkumavky byly uloženy přes noc v -20 °C, potom stočeny (30 min, 10 000 g, 4 °C) a utvořená peleta DNA rozpuštěna ve 200 μ l pufru TE.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (q-PCR)

Reakční směs PCR byla pipetována na 384 jamkovou destičku a analyzována na přístroji 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primery (viz. kapitola 6.1.6) byly navrženy tak, aby měly přibližně stejnou délku a teplotu tání. Délka produktů PCR se pohybovala mezi 100-200 bp. Příslušné dva primery (forward a reverse) byly sloučeny do jedné zkumavky a naředěny na výslednou koncentraci 20 μ M.

Složení reakční směsi PCR

DNA IP vzorku nebo inputu	1 μ l
20 μ M mix primerů	0,2 μ l
ddH ₂ O	2,8 μ l
2x SYBR Green PCR Master Mix	4 μ l

Program cyklu

(Program byl nastaven podle doporučení výrobce směsi SYBR Green PCR Master Mix)

1. krok	5 min, 95 °C	} 40 opakování
2. krok	10 s, 95 °C	
3. krok	20 s, 60 °C	
4. krok	30 s, 72 °C	

8.2.3 Southern blot

Příprava chromatinu

Chromatin byl připraven následovně. Nejprve bylo sklizeno 3×10^6 buněk HeLa transfekovaných příslušnými plazmidy a vektorem pGL3 promoter. Buňky byly dvakrát promyty pufrům PBS a stočeny 5 min, 300 g při 4 °C. Utvořené pelety buněk byly rozsuspendovány v 7 ml vychlazeného pufru CSK a vzniklá buněčná suspenze byla inkubována 7 min na ledu. Po inkubaci bylo provedeno stočení suspenze (2 000 g, 10 min, 4 °C), odstranění supernatantu a rozsuspendování pelet uvolněných buněčných jader ve 400 μ l vychlazeného pufru pro digesci MNázou (bez CaCl₂). Tato směs byla následně přenesena do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a stočena 4 000 g, 10 min, při 4 °C. Pelety byly rozpuštěny ve 200 μ l vychlazeného pufru pro digesci MNázou, který obsahoval CaCl₂ (výsledná koncentrace CaCl₂ v pufru činila 1 mM).

Štěpení MNázou

Směs chromatinu byla rozdělena po 50 μ l do třech nových mikrocentrifugačních zkumavek. Jednotlivé zkumavky byly označeny podle doby inkubace chromatinu s MNázou. Do zkumavek s označením 0' nebyla MNáza přidána. Po napipetování směsi chromatinu byly zkumavky přeneseny na termobloček nastavený na teplotu 25 °C a zahřívány 5 min. Chromatin byl štěpen 5 a 10 min přidáním 0,25 μ l MNázy (výsledná koncentrace MNázy 0,05 U/ml) do reakce. Každá nukleázová reakce byla po uplynutí příslušné doby zastavena přidáním 4 μ l ledově vychlazené 0,5 M EDTA (výsledná koncentrace EDTA 40 mM) a přenesením zkumavky na led. Ke každému vzorku chromatinu bylo po deseti minutách připipetováno 150 μ l ddH₂O, 6 μ l 5 M NaCl (celková koncentrace NaCl 150 mM) a 1 μ l RNázy (odpovídá 10 U). Vzorky byly umístěny do termobločku a třepány 30 min při 37 °C. Po 30 minutách byl ke vzorkům přidán 1 μ l proteinázy K (20 μ g) a teplota zvýšena na 2 h na 65 °C.

Purifikace DNA

Do každého vzorku byl přidán stejný objem neutralizovaného fenolu, jako byl objem MNázové reakce tj. 200 μ l. Zkumavky se vzorky byly třepány 10 min při RT a poté centrifugovány 5 min, 10 000 g, RT. Stočení oddělilo vodnou horní fázi od spodní organické (fenolové). Vodná fáze byla přenesena do nové mikrocentrifugační zkumavky a smíchána s 200 μ l trichlormethanu. Následně bylo provedeno třepání, stočení vzorků a přenesení vodné fáze do nových zkumavek stejně jako v případě purifikace fenolem. Vzorky byly promyty trichlormethanem celkem dvakrát. Nakonec byla ze vzorků precipitována DNA přidáním 1 μ l glykogenu, 20 μ l 3 M acetátu sodného a 500 μ l 96% ethanolu. Samotná precipitace probíhala přes noc v -20°C . Druhý den byly vzorky stočeny (30 min, 10 000 g, 4°C) a peleta DNA rozpuštěna ve 20 μ l pufru TE.

Elektroforéza na agarosovém gelu

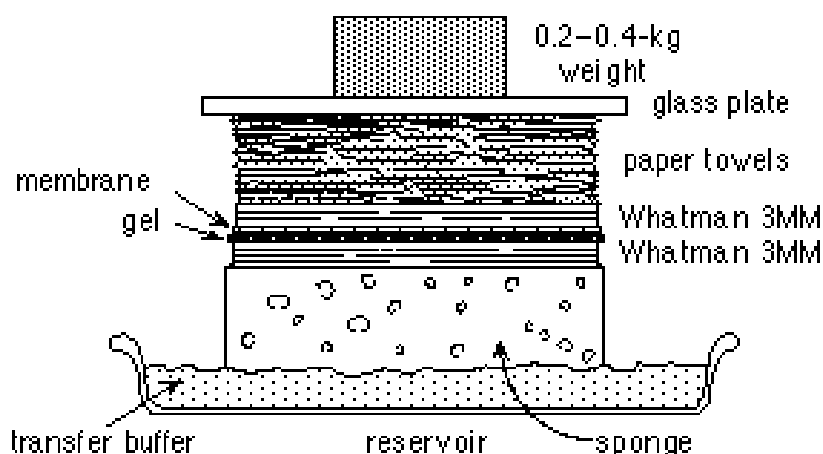
Vzorky purifikované DNA byly naneseny na 1,5% (w/v) agarosový gel společně se vzorkovacím pufrům. Byl použit standard molekulových hmotností pro malé fragmenty DNA – Low Range DNA Ladder (Fermentas). Napětí mezi elektrodami bylo nastaveno na 50 V. Přibližně 2,5 h od začátku elektroforézy byl agarosový gel přenesen na transiluminátor, fragmenty DNA v něm zviditelněny a vyfoceny.

Southern Blotting

Agarosový gel s odseparovanými fragmenty DNA byl opláchnut destilovanou vodou a přenesen v Petriho misce na kývačku. Do Petriho misky s gelem bylo přidáno 200 ml denaturačního roztoku (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) a tato soustava byla třepána 20 min při RT. Po uplynutí stanovené doby byl denaturační roztok vyměněn za nový a soustava byla třepána dalších 20 min. Denaturační roztok byl následně z misky vylit a nahrazen 200 ml neutralizačního roztoku (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH=7,0). Inkubace gelu s neutralizačním roztokem byla provedena také 2x20 min.

Pro kapilární přenos DNA z agarosového gelu na membránu bylo nutné sestavit tzv. „blotovací pyramidu“. Základ této pyramidy tvořily dvě houbičky na nádobí umístěné do rezervoáru s roztokem 20x SSC. Na houbičky byly vyrovnány tři kusy 3 mm papírů Whatman, které byly předem namočené do roztoku 20x SSC. Následně byl na blotovací papíry položen neutralizovaný agarosový gel. Agarosový gel byl pokládán tak, aby pod ním nevznikly žádné vzduchové bubliny. Pokud se pod gelem přeci jen nějaké vyskytly, byly vytlačeny válčováním povrchu gelu sérologickou pipetou. Aby se zabránilo obtékání roztoku 20x SSC při „blotování“ a zvýšila se účinnost přenosu DNA, byly všechny čtyři okraje agarosového gelu překryty úzkými proužky parafilmu. Následně byla vystřižena nylonová membrána o stejných rozměrech jako gel. Membrána byla nejprve ponořena na 5 min do destilované vody a poté přenesena na blotovací pyramidu. Po jejím přenosu byly vzduchové bubliny opět vytlačeny válčováním sérologickou pipetou. Na nylonovou membránu bylo nalito několik mililitrů roztoku 20x SSC a umístěn na ní tenký filtrační papír. Dále bylo na pyramidu vyskládáno pět kusů 3 mm papírů Whatman a přibližně 10 cm vysoká vrstva buničité vaty. Vrchol pyramidy tvořila skleněná destička zatížená 200 g závažím.

Obrázek: „Blotovací pyramida“



Zdroj: Current Protocols in Molecular Biology

Přibližně za 20 h byla blotovací pyramida rozebrána. Nejprve byla odstraněna buničitá vata a 3 mm papíry Whatman. Na odhalenou nylonovou membránu byly tužkou vyznačeny pozice jednotlivých jamek agarosového gelu. Aby byla rozeznatelná orientace membrány ve všech směrech, byl asymetricky odříznut jeden z jejích rohů. Membrána byla opláchnuta v roztoku 2x SSC a poté položena svou rubovou stranou (kde nebyla vázána DNA) na suchý filtrační papír. Po jejím kompletním vysušení bylo nutné imobilizovat DNA na povrch membrány. Membrána proto byla přenesena na transiluminátor a její lícová strana exponována UV světlem (300 nm) po dobu 55 s. Pro zjištění účinnosti přenosu DNA na membránu byl agarosový gel znovu obarven EtBr (v roztoku EtBr o koncentraci 0,5 µg/ml) a vyfocen.

Vytvoření hybridizačních prób pomocí PCR

Hybridizační próby byly vytvořeny amplifikací třech různých úseků genu kódujícího luciferázu. Tyto úseky se nepřekrývaly a byly ohraničeny následujícími dvojicemi primerů:

F3R4 – 441 bp dlouhý úsek

F5R6 – 500 bp dlouhý úsek

F7R9 – 466 bp dlouhý úsek

Kvůli pozdější detekci byly do molekul prób zainkorporovány radioaktivní nukleotidy [α - ^{32}P]dATP.

Byly provedeny tři různé reakce PCR se třemi různými dvojicemi primerů (viz. výše). Příslušné dvojice primerů byly před napipetováním do reakce naředěny do tzv. „mixu primerů“ na výslednou koncentraci 10 µM.

Mix primerů

200 µM F primer	1 µl
200 µM R primer	1 µl
ddH ₂ O	18 µl

Jednotlivé reakce PCR byly pipetovány do celkového objemu 20 μl . Vzhledem k velice nízké výsledné koncentraci radioaktivního nukleotidu ($\sim 0,16 \mu\text{M}$) bylo nutné do reakce PCR přidat ještě neznačený nukleotid dATP. Empiricky byla určena výsledná koncentrace neznačeného nukleotidu na 20 μM (data nejsou ukázána).

Složení reakční směsi PCR

iTaq buffer	2 μl
10 mM dNTP (bez ATP)	0,8 μl
50 mM MgCl_2	1 μl
DMSO	0,4 μl
iTaq polymeráza	0,16 μl
DNA templát	1,6 μl (80 ng)
1 mM dATP	0,4 μl
10 μM mix primerů	0,8 μl
ddH ₂ O	10,34 μl
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$	2,5 μl

Program cyklieru

teplota víka	98 °C	
1. krok	95 °C, 3 min	
2. krok	95 °C, 40 s	} 35 opakování
3. krok	60 °C, 40 s	
4. krok	72 °C, 45 s	
5. krok	72 °C, 10 min	
udržovací teplota	4 °C	

Oddělení radioaktivně značené DNA od neinkorporovaných dNTP pomocí kolonkové chromatografie

Kolonka pro oddělení značené DNA od nukleotidů byla vytvořena z injekční stříkačky (inzulínky), skelné vaty a matrice Sephadex G-50. Injekční stříkačka byla zbavena pístu, upevněna do držáku na zkumavky a poté bylo její dno (místo nasouvání jehly) ucpáno kouskem skelné vaty. Matrice musela být před použitím nejprve „nabobtnána“ – tzn., že bylo rozpuštěno 10 g matrice Sephadex G-50 ve 100 μl pufru TE a tato směs byla inkubována přes noc při RT. „Nabobtnaná“ matrice byla opatrně pipetována do těla injekční stříkačky až do chvíle, než byla injekční stříkačka téměř zcela zaplněna (musel zbýt ještě prostor pro vzorek). Před vyrobenou kolonku byl umístěn ochranný štít proti radioaktivnímu záření a pod ní byla umístěna mikrocentrifugační zkumavka jímající eluát. Na kolonku byl napipetován vzorek (produkty reakce PCR) a 200 μl čistého pufru TE. Byla jímána první frakce. Zkumavka, která byla umístěna pod kolonkou, byla po prokapání veškerého eluátu vyměněna za novou. Na kolonku bylo znovu pipetováno 200 μl pufru TE a byla jímána druhá frakce. Ve výsledku bylo získáno 5 elucí s různou intenzitou radioaktivity. Nejvyšší intenzita radioaktivity byla ve druhé a třetí eluci, protože obsahovaly naamplifikované fragmenty DNA – próby. Tyto dvě eluce byly sloučeny do jedné zkumavky a použity na hybridizační analýzu.

Hybridizační analýza „přebílotované“ DNA pomocí radioaktivně značené DNA próby

Následující kroky byly provedeny za ochranným štítem proti radioaktivnímu záření. Suchá nylonová membrána s imobilizovanou DNA byla ponořena do roztoku 6x SSC a poté přemístěna do hybridizačního válce (rubová strana membrány ležela na stěnách válce). Do hybridizačního válce bylo k membráně napipetováno 7 ml roztoku PerfectHyb Plus (Sigma). Válec byl uzavřen a umístěn do hybridizační pece nastavené na 68 °C.

Dále bylo nutné denaturovat radioaktivně značené DNA próby. Zkumavka s roztokem prób byla umístěna na 15 min do vroucí vodní lázně a poté okamžitě přenesena na led. Po deseti minutách byl roztok denaturovaných prób přepipetován do 15 ml centrifugační zkumavky a smíchán společně se 7 ml roztoku PerfectHyb Plus. Směs obou těchto roztoků byla přehřátá na 68 °C.

Hybridizační válec byl po 2 hodinách vyjmut z pece, roztok PerfectHyb Plus z něj byl odstraněn a nahrazen novým (přehřátým) roztokem s rozpuštěnými próbami. Válec byl opět uzavřen a vrácen do hybridizační pece. Inkubace soustavy probíhala přes noc. Druhý den byl hybridizační roztok (roztok PerfectHyb Plus s próbami) vylit z válce do 15 ml centrifugační zkumavky a po vychladnutí zamražen (dá se použít opakovaně). Kvůli nespecifické vazbě DNA prób na imobilizované fragmenty DNA byla nylonová membrána promyta v hybridizačním válci následujícím způsobem:

1. promytí - 10 min při otevřené peci roztokem 2x SSC/0,1% SDS (15 ml roztoku, po 5 min vyměněn za čerstvý)
2. promytí – 10 min při otevřené peci roztokem 0,2x SSC/0,1% SDS (10 ml roztoku, po 5 min vyměněn za čerstvý)
3. promytí – 30 min v 50 °C roztokem 0,2x SSC/0,1% SDS (10 ml přehřátého roztoku na 50 °C, po 15 min vyměněn za čerstvý)

Po třetím promytí byl hybridizační válec otevřen, promývací roztok vylit a nylonová membrána přenesena do Petriho misky s roztokem 2x SSC. Mokrý membrána byla následně zatavena do igelitové fólie a umístěna do desek s rentgenovým filmem. Po 48 h byl vyvolán autoradiograf.

8.2.4 Ostatní

Transformace kompetentních buněk DH5α

Nejprve bylo 25 µl zamražené bakteriální kultury rozehřáno na ledu. K rozehřáté kultuře bylo připipetováno 1-2 µl plasmidové DNA (minimálně však 50 ng). Směs byla opatrně rozsuspendována a inkubována na ledu 30 min. Byl proveden teplotní šok bakteriálních buněk zahřáním směsi na 42 °C po dobu 20 s. Ihned po teplotním šoku byla směs přenesena na led, kde zůstala další 2 min. Dále bylo, k již transformovaným buňkám, připipetováno 300 µl přehřátého S.O.C. média a tato směs se nechala inkubovat v třepačce 1,5 h, 225 rpm při 37 °C. Buňky byly následně vysety na Petriho misky s živným agarem a antibiotikem ve dvou různých množstvích – 50 µl a 250 µl. Petriho misky s vysetými bakteriemi byly ponechány přes noc ve 37 °C.

Midipreparace plasmidové DNA

Transformované bakterie s požadovaným plasmidem byly buď vypíchnuty z kolonie vypěstované na živném agaru (viz. výše), nebo získány ze zamražené bakteriální konzervy (viz. dále) a přeneseny do 4 ml LB média s antibiotikem. V tomto médiu byly třepány 5 h, 225 rpm při 37 °C. Část buněk (2 ml) v exponenciální fázi růstu byla napipetována do 100 ml nového média a třepána přes noc. Zbylá část byla zamražena nebo uložena do 4 °C pro případné další použití. Druhý den byla narostlá buněčná kultura přenesena do dvou 50 ml zkumavek Falcon a stočena na centrifuze s fixním rotorem 20 min, 8 000 g, 4 °C. Na samotnou izolaci plasmidové DNA z bakterií byl použit midipreparační kit JETspin (Genomed). Další kroky byly provedeny podle pokynů výrobce.

Zamrazování bakteriální kultury

Pro vytvoření bakteriálních konzerv byla vždy použita buněčná kultura ve své exponenciální fázi růstu. 800 µl této kultury bylo přeneseno do mikrocentrifugační zkumavky se šroubovacím uzávěrem, která již obsahovala 200 µl glycerolu (výsledná koncentrace glycerolu činila 20 % w/v). Suspenze byla důkladně rozsuspendována a uložena do -80 °C

Restrikční štěpení

Byla uskutečněna následující restrikční reakce a to s endonukleázami HindIII a XbaI. Cílem této reakce bylo vyštěpení kódující oblasti genu luciferázy z DNA vektoru pGL3 promoter. Vzhledem k velikosti fragmentu (tvoří 33,7% velikosti vektoru) a nízké účinnosti extrakce DNA z gelu byla reakce provedena v celkovém objemu 100 µl. Informace o vhodných reakčních podmínkách byly zjištěny na internetových stránkách výrobce (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>).

DNA vektoru pGL3 promoter	15,9 µl (15 µg)
pufr 10x Tango	10 µl
HindIII	5 µl
XbaI	2,5 µl
ddH ₂ O	66,6 µl

Napipetovaná reakce byla důkladně promíchána, stočena na stolní centrifuze a inkubována 17 h při 37 °C. Výsledné fragmenty byly od sebe odděleny za pomoci elektroforézy na agarosovém gelu.

Elektroforéza na agarosovém gelu

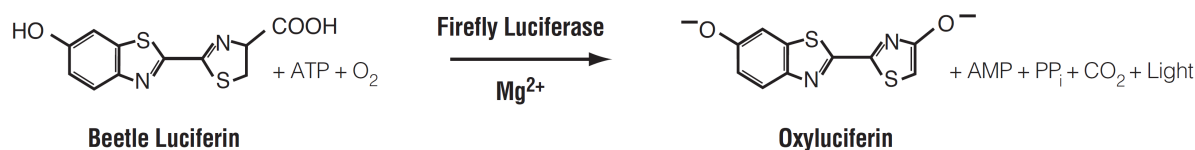
Na elektroforézu velkých fragmentů (>1 500 bp) byl použit 0,8% (w/v) agarosový gel. Rozdělení malých fragmentů (<1 000 bp) bylo prováděno na 1,5% (w/v) agarosovém gelu. Výsledná koncentrace ethidium bromidu v gelu činila 0,5 µg/ml. Ke každému vzorku DNA byl vždy připipetován roztok 6x MassRuler Loading Dye (Fermentas) v poměru 1:5 a poté byly jednotlivé vzorky umístěny do jamiček v agarosovém gelu. Podle předpokládané velikosti hledaného fragmentu byl vybrán příslušný standard molekulových hmotností (High/Low Range DNA Ladder od firmy Fermentas). Samotná elektroforéza probíhala v pufru TBE a při stálém napětí 5 V na 1 cm délky gelu. Po skončení elektroforézy (modrý pruh vzorkovacího pufru ve ¾ délky gelu) byly vzorky zviditelněny světlem transiluminátoru o vlnové délce 300 nm a vyfoceny fotoaparátem Panasonic DMC-LS1.

Izolace DNA z agarosového gelu

Fragmenty určené k izolaci z agarosového gelu byly nejprve vyštěpeny z původní DNA za pomoci restrikčních endonukleáz. Následně byly separovány od ostatní DNA na ethidium bromidem barveném agarosovém gelu. Po elektroforéze byly fragmenty zviditelněny na transiluminátoru, v co nejkratším čase vyříznuty z gelu (UV poškozuje DNA) a přeneseny do mikrocentrifugační zkušavky. Pro extrakci DNA z gelu byl použit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Luciferázová analýza

Luciferázová analýza byla využita ke sledování transkripční aktivity transfekovaného vektoru pGL3 promotor v buňkách HeLa. Míra transkripční aktivity vektoru pGL3 promotor odpovídá množství nasyntetizovaného genového produktu – Luciferázy, který tento plazmid kóduje. Protože Luciferáza je enzym schopný oxidovat svůj substrát (luciferin) v přítomnosti ATP a O_2 na světélkující oxyluciferin, je míra exprese vektoru přímo úměrná intenzitě vyprodukovaného světla – luminiscenci. Míra transkripční aktivity plazmidu byla tedy určována měřením luminiscence buněčných lyzátů, ke kterým byl přidán luciferázový substrát. Pro luciferázovou analýzu byl použit kit Steady-Glo Luciferase Assay System od firmy Promega.



Zdroj: <http://www.promega.com>

Buňky HeLa byly sklizeny 24 hodin po transfekci vektoru pGL3 promotor a lyzovány ve 100 μ l pufru 1x Glo Lysis. Po pěti minutách inkubace buněk s lyzačním pufrem byla vzniklá suspenze důkladně propipetována a část (4 μ l) této suspenze přenesena do nových zkušavek. K lyzátům bylo přidáno 100 μ l vytemperovaného (RT) pufru Steady-Glo Luciferase Assay s rozpuštěným substrátem (výsledná koncentrace substrátu činila 71 mg/ml) a po 10 min byla měřena intenzita chemiluminiscence na luminometru.

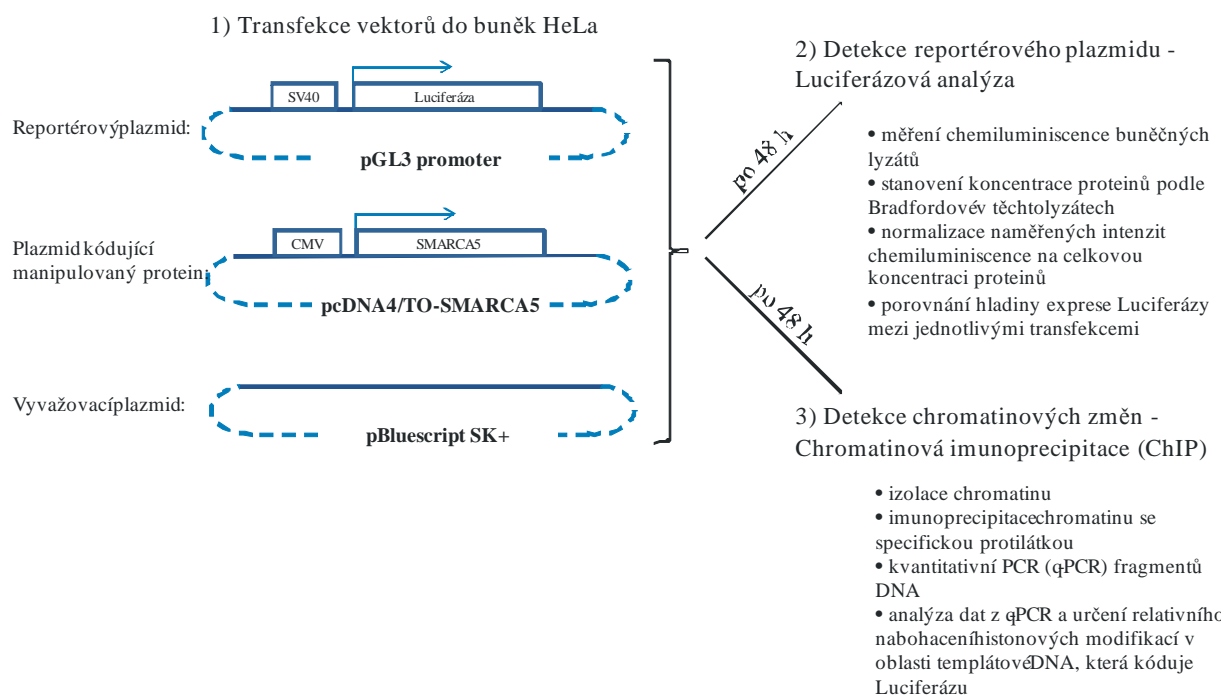
Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Po stanovení hodnot chemiluminiscence v luciferázové analýze bylo nutné tyto data normalizovat na celkovou koncentraci proteinu v buňkách. Celková koncentrace proteinu, respektive jí odpovídající absorbance, byla určena podle metody Bradfordové. Do každé kyvety mikroUV bylo nepipetováno 99 μ l činidla Bradfordové a 1 μ l příslušného vzorku. Následně byla měřena absorbance jednotlivých vzorků na spektrofotometru BioPhotometer (eppendorf) při vlnové délce 595 nm. Jako blank byl použit 1 μ l pufru Glo Lysis rozpuštěný v 99 μ l činidla Bradfordové, protože jednotlivé vzorky byly získány odebráním části lyzátů (4 μ l) z luciferázové analýzy (viz. výše).

9 Výsledky

9.1 Vytvoření a optimalizace systému pro studium chromatin remodelujícího faktoru SMARCA5

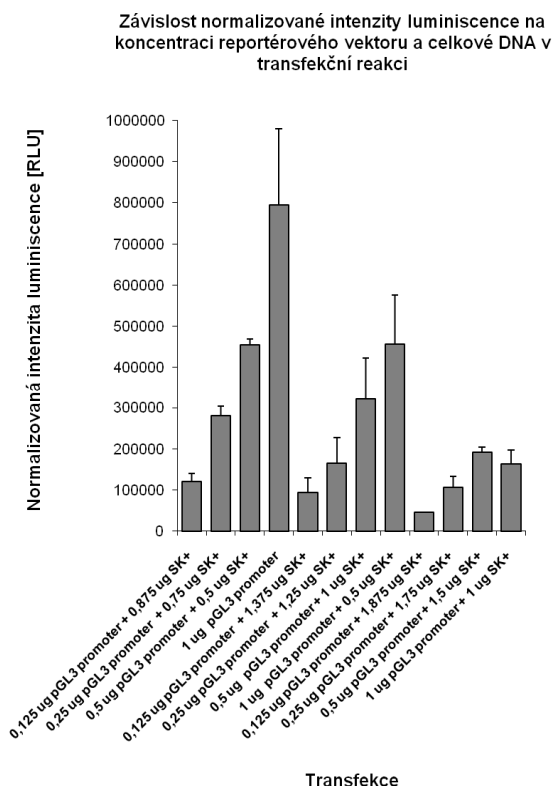
Systém pro sledování vlivu proteinu SMARCA5 na transkripci vneseného DNA templátu byl navržen následujícím způsobem. Do lidské nádorové linie buněk HeLa, která je vhodná pro studium vlivu transaktivačních faktorů na transkripci (viz. 6.1.7 Organismy) byly za pomoci lipofekčního činidla Lipofectamine 2000 transfekovány tyto plazmidy - pcDNA4/TO-SMARCA5, SK+ a pGL3 promotor. Vektor pcDNA4/TO-SMARCA5 obsahuje cDNA proteinu SMARCA5, která je pod kontrolou silného cytomegalovirového (CMV) promotoru. Díky CMV promotoru byla zajištěná vysoká intracelulární hladina proteinu SMARCA5 v buňkách HeLa. Vektor SK+ není v eukaryotních buňkách transkribován, proto byl použitý jako tzv. „vyvažovací plazmid“. Tento plazmid sloužil především pro doplnění do celkové koncentrace DNA vkládané do buněk. Vektor pGL3 promotor obsahuje modifikovanou kódující oblast enzymu Luciferáza, jejíž transkripce je pod kontrolou promotoru SV40. Promotor SV40 zajišťoval vysokou produkci tohoto reportérového enzymu v buňkách HeLa, což nám umožňovalo velice senzitivně detekovat případné změny v jeho expresi. Relativní hladina exprese enzymu Luciferáza byla určována 48 h po transfekci za pomoci Luciferázové analýzy (viz. 6.2.4 Ostatní – Luciferázová analýza). Luciferázová analýza byla provedena v době, kdy buňky již měly nasyntetizovány proteinové produkty kódujících oblastí jednotlivých plazmidů, které do nich byly transfekovány. Z předchozích pokusů naší laboratoře byl tento časový interval empiricky stanoven na 48 h po transfekci. Dále byl vektor pGL3 promotor použitý jako tzv. DNA templát, protože naše hypotéza předpokládá, že se tento vektor po vstupu do buněk stává předmětem vazby histonů a tvorby chromatinové struktury. Tato možnost je podpořena dalšími autory (Jeong and Stein 1994; Lukacs, Haggie et al. 2000). Přítomnost histonů a jejich modifikací byla na tomto plazmidu detekována za pomoci chromatinové imunoprecipitace a kvantitativní PCR (q-PCR) 48 h po transfekci [viz. 6.2.2 Chromatinová imunoprecipitace (ChIP)].



Obrázek 9-1: Systém pro sledování vlivu proteinu SMARCA5 na transkripci vneseného DNA templátu. Tento systém byl založen na společné ko-transfekci vektorů pGL3 promoter, pcDNA4/TO-SMARCA5 a SK+ do buněk HeLa. Po 48 h byly transfekované buňky sklizeny a použity na Luciferázovou analýzu a chromatinovou imunoprecipitaci. Luciferázovou analýzou byla zjišťována relativní exprese proteinu Luciferáza v buňkách. Chromatinovou imunoprecipitací byla zjišťována přítomnost např. histonů a histonových modifikací na DNA templátu v oblasti kódující protein Luciferázu.

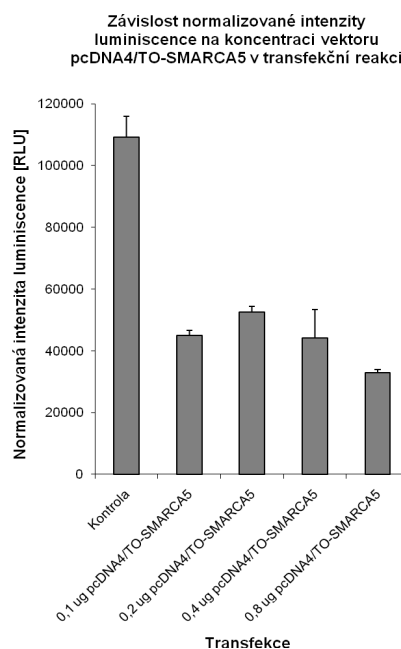
Vytvoření *in vitro* systému pro studium vlivu proteinu SMARCA5 na transkripci vneseného reportérového plazmidu vyžadovalo empiricky určit, jaké množství jednotlivých vektorů se bude do buněk transfekovat. Cílem tohoto testování bylo nejprve zjistit optimální koncentraci vektoru pGL3 promotor v transfekční směsi a zároveň určit takovou celkovou koncentraci DNA v transfekční směsi, která by neovlivňovala viabilitu buněk a také transkripci samotného vektoru pGL3 promotor. Buňky HeLa ($\sim 2 \times 10^5$ buněk na ploše 4 cm^2) byly proto transfekovány různými množstvími plazmidu pGL3 promotor (0,125 μg , 0,25 μg , 0,5 μg a 1 μg) a tato množství byla „vyvážena“ vektorem SK+ do celkové koncentrace DNA – 1 μg , 1,5 μg a 2 μg . Transfekce byly provedeny na 12-ti jamkové destičce, což, vzhledem k množství buněk ($\sim 2 \times 10^5$ buněk na jamku), umožňovalo detekci exprese proteinu Luciferázy. Po 48 h byly transfekované buňky sklizeny a podrobeny Luciferázové analýze. Z naměřených dat vyplynulo, že exprese proteinu Luciferáza buňkami HeLa byla téměř lineárně závislá na koncentraci vektoru pGL3 promotor v transfekční reakci (viz. graf 9-1). Ovšem dále tato data ukázala výrazný negativní vliv zvyšujícího se množství vkládané DNA na transkripci reportérové DNA a viabilitu buněk. Nejvyšší normalizovanou intenzitu luminiscence vykazovala transfekce s 1 μg vektoru pGL3 promotor a s celkovou koncentrací

vkládáné DNA 1 μg (viz. graf 9-1 čtvrtý sloupec zleva). Tato transfekce nebyla ovšem pro potřeby našeho systému optimální z důvodu příliš vysoké koncentrace reportérového plazmidu v transfekční směsi. Vzhledem k pozdější plánované ko-transfekci několika plazmidů společně s vektorem pGL3 promoter bylo nutné vybrat takovou celkovou koncentraci vkládané DNA, která by byla vyšší než 1 μg , ale nižší než koncentrace DNA, jež by inhibovala buněčný růst. Dále tento požadavek vyžadoval výběr co nejmenší, ale přesto dostatečné, koncentrace vektoru pGL3 promoter v reakční směsi. Z našich dat bylo odvozeno (viz. graf 9-1), že minimální koncentrace reportérového plazmidu, která by dosahovala významné odpovědi je použití 0,3 μg vektoru pGL3 promoter na jednu transfekční reakci. Současně maximální koncentrace celkové DNA vkládané do buněk, která by nesnižovala buněčnou viabilitu byla odvozena na 1,3 μg . Z popsanych důvodů jsme získali v jedné transfekční reakci 1 μg využitelné koncentrace pro další plazmidy.



Graf 9-1: Luciferázová analýza transfekovaných buněk HeLa. Bylo provedeno 12 různých transfekcí (na 12-ti jamkové destičce) do buněk HeLa pro zjištění optimálního množství reportérového vektoru pGL3 promoter vkládaného do buněk a pro určení maximální koncentrace DNA v jedné transfekční reakci. Těchto 12 transfekcí bylo rozděleno do čtveřic, které se lišily celkovou koncentrací DNA v transfekční reakci (zleva: 1 μg , 1,5 μg a 2 μg). V rámci kvadruplikátu byl vektor pGL3 promoter titrován následovně – zleva: 0,125 μg , 0,25 μg , 0,5 μg a 1 μg . Intenzity luminiscence jsou normalizovány na celkovou koncentraci proteinů a uvedeny v jednotkách RLU (Relative Light Units).

V další fázi vývoje tohoto systému bylo nutné zjistit ideální koncentraci vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 v transfekční směsi. Za ideální jsme považovali takovou koncentraci vektoru, která opět by byla co nejnižší a zároveň měla výrazný vliv na transkripci plazmidu pGL3 promotor. Bylo provedeno pět testovacích transfekcí do buněk HeLa. První z nich sloužila jako referenční, protože neobsahovala vektor pcDNA4/TO-SMARCA5. V ostatních čtyřech transfekčních reakcích byl tento vektor přítomen a to v následujících koncentracích – 0,1 μ g, 0,2 μ g, 0,4 μ g a 0,8 μ g. Všech pět reakcí dále obsahovalo 0,3 μ g reportérového vektoru pGL3 promotor a vektor SK+, který doplňoval celkovou koncentraci DNA do 1,3 μ g. 48 hodin po provedení transfekcí byly buňky HeLa sklizeny a podrobeny Luciferázové analýze. Detekce reportérového enzymu Luciferáza ukázala výrazný (~ trojnásobný) propad intenzity luminiscence už při nejnižší koncentraci (0,1 μ g) vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 ve srovnání s kontrolou (viz. graf 9-2). Další zvyšování množství tohoto vektoru v transfekční reakci již prakticky nemělo vliv na další snižování intenzity luminiscence a tedy ani na inhibici transkripce genu Luciferázy. Hodnota koncentrace 0,1 μ g vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 byla optimální. Ovšem pro budoucí pokusy jsme vybrali koncentraci 0,2 μ g ve které dosahovala inhibice transkripce reportérového plazmidu plateau. Množství 0,2 μ g také zaručovalo, že případné chyby v pipetování a odchylky v ředění DNA tohoto vektoru, nebudou mít výrazný vliv na sníženou transkripci genu Luciferázy.



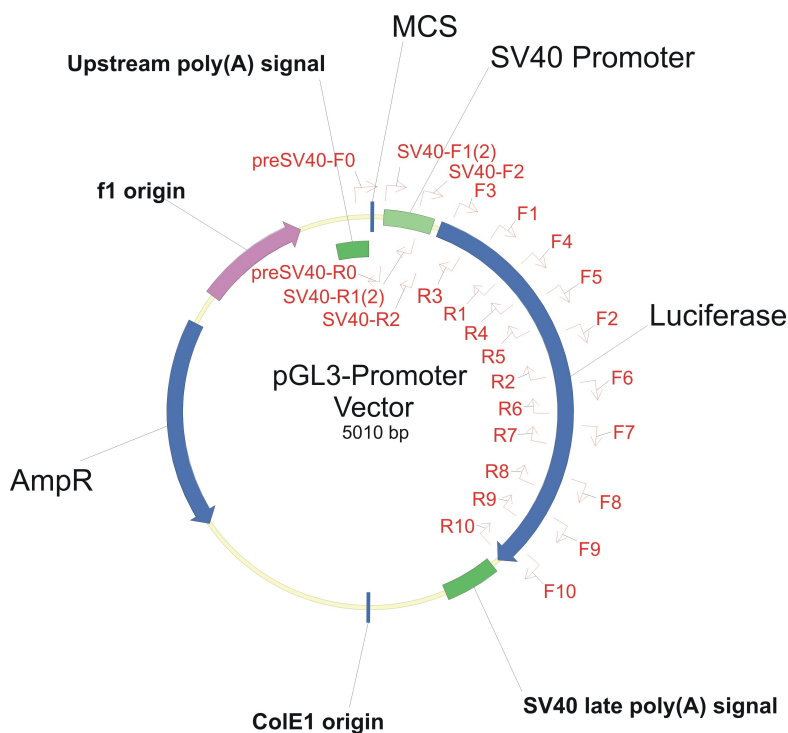
Graf 9-2: Luciferázová analýza transfekovaných buněk HeLa. Pro určení vhodného množství vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 vkládaného do buněk bylo provedeno pět transfekcí. Kontrolní transfekce byla provedena bez vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5. Do následujících transfekčních reakcí bylo

pipetováno 0,1 µg, 0,2 µg, 0,4 µg a 0,8 µg tohoto vektoru. Už při nejnižší koncentraci plazmidu pcDNA3/SMARCA5 (0,1 µg) byl výrazný propad v intenzitě luminiscence oproti kontrole. Koncentrace vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 0,2 µg (na obrázku třetí sloupec) dosahovala plateau inhibice transkripce reportéru, proto byla vybrána pro následující pokusy. Intenzity luminiscence jsou normalizovány na celkovou koncentraci proteinů a uvedeny v jednotkách RLU (Relative Light Units).

Jak už bylo řečeno, metody chromatinové imunoprecipitace (ChIP) a q-PCR nám umožňovaly pozorovat přítomnost histonů, modifikovaných histonů a chromatin vazebných faktorů na vneseném DNA templátu. Metoda ChIP je založena na detekci fragmentů DNA, které asociují se specifickým proteinem. Tyto fragmenty DNA byly získány následujícím způsobem. Nejprve byl z transfekovaných buněk izolován chromatin, ten následně fragmentován sonikací a poté byla provedena inkubace směsi rozsonikovaného chromatinu s protilátkami, které vázaly epitopy konkrétního proteinu. Důležité je zmínit, že protilátky byly ještě před přidáním fragmentů chromatinu imobilizovány na pevnou matici, což umožňovalo efektivní odmytí nenavázaného buněčného materiálu. Následně po inkubaci se specifickou protilátkou a odmytí nenavázaného buněčného materiálu byly purifikované proteiny (stejně tak i protilátky) degradovány proteázou. Pokud byl purifikovaný protein asociován s DNA, byla tato DNA uvolněna do roztoku a z něj poté extrakcí ethanolem vysrážena a vyizolována. Tímto procesem se ve výsledku získala směs pouze takových fragmentů DNA, které byly rozeznány proteinem našeho zájmu (např. histonem nebo chromatin vazebným faktorem). Metoda ChIP je kvantitativní analýzou a vyžaduje izolaci chromatinu z velkého počtu buněk. V důsledku toho může mít část fragmentů DNA v získané směsi shodné nukleotidové sekvence, protože mohou pocházet ze stejného místa chromozómu. Velikost frakce fragmentů DNA se shodnými sekvencemi ve směsi pak odpovídá velikosti tzv. relativního nabohacení proteinu našeho zájmu v dané oblasti chromozómu. V našem případě nás zajímaly relativní četnosti těch fragmentů DNA, které pocházely z vektoru pGL3 promotor, konkrétně z promotoru SV40 a oblasti, jež kódovala protein Luciferázu. Relativní nabohacení proteinů našeho zájmu v těchto oblastech vektoru pGL3 promotor byla určována za pomoci kvantitativní PCR (viz. 6.2.2 Chromatinová imunoprecipitace) s reakční směsí Power SYBR Green PCR Master mix od firmy Applied Biosystems.

Metoda q-PCR je založena na detekci a kvantifikaci fluorescenčního signálu, který je přímo uměrný množství vznikajícího produktu PCR. V našem případě byla q-PCR prováděna na cykleru 7900HT (Applied Biosystems), jež umožňoval mimo jiné, v reálném čase sledovat fluorescenci barvičky SYBR Green I a to současně až v 384 reakcích. Fluorescence této barvičky se zvyšuje přibližně tisícinásobně po vazbě na dsDNA a zároveň se vzrůstajícím

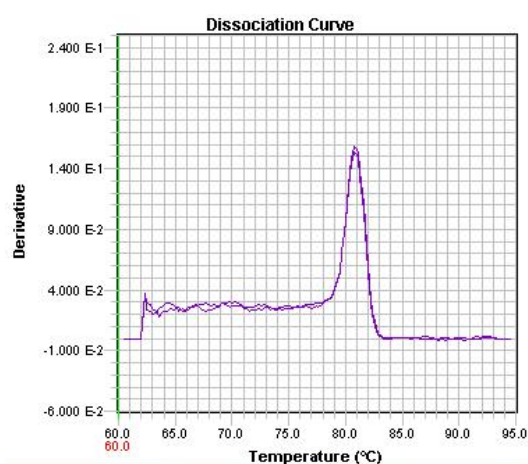
množstvím produktu PCR (amplikonů) roste i celkový fluorescenční signál. Kvantifikací fluorescenčního signálu barvičky SYBR Green I za pomoci cyklu 7900HT bylo možno v reálném čase také kvantifikovat množství amplikonů, tedy specificky naamplifikovaných úseků DNA, v reakcích PCR. V našem případě vznikly tyto amplikony amplifikací konkrétních oblastí vektoru pGL3 promoter. Z naměřené kvantifikace amplikonů byla posléze určována relativní četnost fragmentů DNA reportérového plazmidu ve směsi fragmentů DNA, které byly získány metodou ChIP. Abychom tedy mohli detekovat chromatinové změny na reportérovém vektoru pGL3 promoter, bylo nutné navrhnout primery pro q-PCR. V našich předchozích pokusech jsme zjistili, že metodou ChIP získáme směs fragmentů DNA o velikostech 200-1000 bp. Bylo proto potřeba navrhnout takové dvojice primerů, které by vymezovaly amplikony o délce ~200 bp a menší. Amplifikací větších úseků než 200 bp bychom se totiž připravili o část informace, která je uložena v malých fragmentech DNA. Pro q-PCR byly navrženy výše popsané primery (viz. 6.1.6 Primery), které byly specifické pro oblasti buď SV40 promotoru nebo kodující oblasti proteinu Luciferáza vektoru pGL3 promoter (viz. obrázek 9-2). Příslušný amplikon vymezovaly dvojice primerů F (forward) a R (reverse).



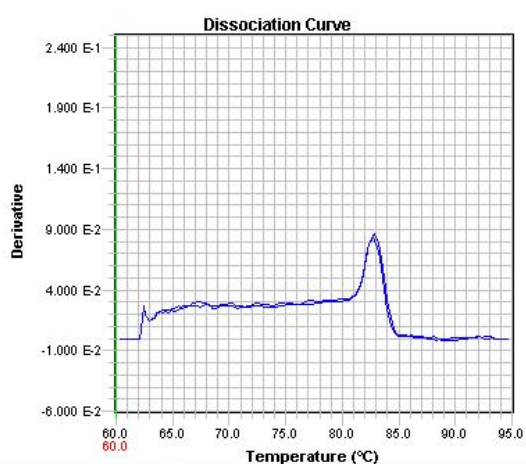
Obrázek 9-2: Vektor pGL3 promoter se schématicky vyznačenými vazebnými místy pro jednotlivé navržené primery (červeně). Šipky představují orientaci primeru od jeho 5' k 3' konci a určují tedy i směr polymerázové reakce. Příslušné primery F (forward) a R (reverse) vymezují oblast (tzv. amplikon) templátové DNA, která byla amplifikována reakcí PCR. Velikosti jednotlivých amplikonů byly v rozsahu přibližně 100-200 bp.

Navržené primery (viz. 6.1.6 Primery), před tím než byly použity v dalších pokusech, musely být testovány na vznik specifického produktu PCR. Templátová DNA pro q-PCR na testování primerů byla získána následujícím způsobem. Byla provedena transfekce vektorů pGL3 promoter a SK+ do buněk HeLa. Tato transfekce byla uskutečněna, vzhledem k větší potřebě buněk, na 6-ti jamkové destičce ($\sim 5 \times 10^5$ buněk na jamku). Množství jednotlivých plazmidů v transfekční směsi proto muselo být navýšeno na 0,75 μg pro vektor pGL3 promoter a na 2,5 μg pro vektor SK+. 48 h po transfekci byly buňky HeLa sklizeny a následně z nich byl izolován chromatin. Po izolaci byl chromatin rozsonikován a inkubován přes noc v roztoku Proteinázy K. Veškerá DNA byla posléze z tohoto roztoku purifikována za pomoci ethanolové precipitace, naředěna na koncentraci 2,5 ng/ μl a použita jako templátová DNA pro q-PCR (viz. 6.2.2 Chromatinová imunoprecipitace). S touto templátovou DNA byly provedeny, pro zajištění přesnosti výsledku, duplikované testovací reakce PCR pro příslušné dvojice navržených primerů. Následně byl za pomoci softwaru SDS (Applied Biosystems), který byl dodán společně se cyklerem 7900HT, analyzován vznik specifického produktu v těchto reakcích. Vznik produktů v reakci PCR nejlépe charakterizují disociační křivky, jež je tento software po schlazení a následném postupném zahřátí výsledného produktu PCR schopen vygenerovat. Na ose y jsou vyneseny hodnoty první derivace normalizované intenzity fluorescence a na ose x teplota ve stupních Celsia. Na tomto typu grafu disociačních křivek je tedy zobrazena velikost změny normalizované intenzity fluorescence při dané teplotě (viz. graf 9-3). V našem případě je nejvyšší změna intenzity fluorescence při teplotě tání vzniklého produktu PCR (vrchol křivky, tzv. peak). O vhodnosti a budoucím použití dané dvojice primerů rozhodovalo především, zdali v PCR reakci vzniká pouze specifický produkt (jeden peak). Empiricky bylo odvozeno, že teplota tání specifického produktu q-PCR by se měla pohybovat v rozmezí přibližně 75-85 °C. Pokud by současně vznikal i nespecifický produkt, disociační křivka by měla dva peaky. Další prioritou reakční směsi bylo, aby vzniklý produkt dával co nejvyšší signál (výška peaku). To bylo ovšem, například v případě amplikonu vymezeného primery SV40-F1(2) a SV40-R1(2), velice těžké dodržet. Z předešlých pokusů bylo zjištěno, že v oblasti promotoru SV40, ve které tento amplikon vzniká, je pro účely q-PCR velice obtížné designovat jakýkoliv jiný „funkční“ primer. Jako optimální kombinace primerů pro amplifikaci této oblasti promotoru SV40 se z provedených pokusů ukázala být pouze dvojice SV40-F1(2) a SV40-R1(2) (data nejsou ukázána).

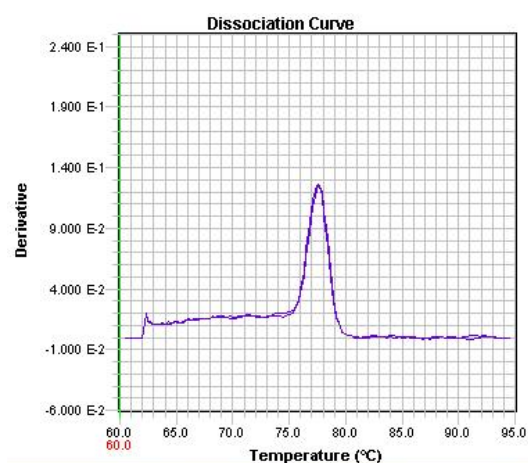
preSV40-F0R0



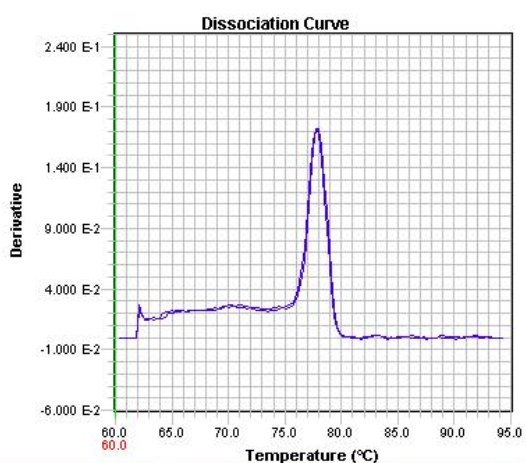
SV40-F1(2)R1(2)



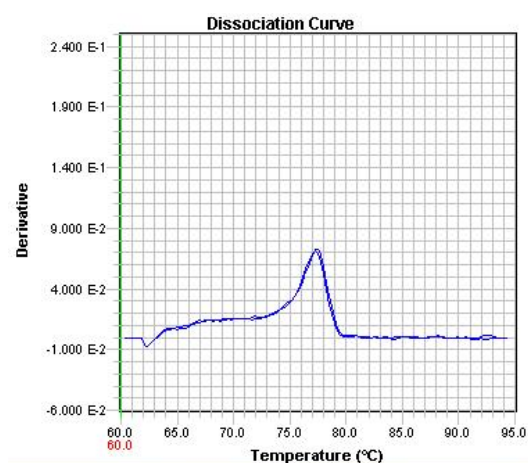
SV40-F2R2



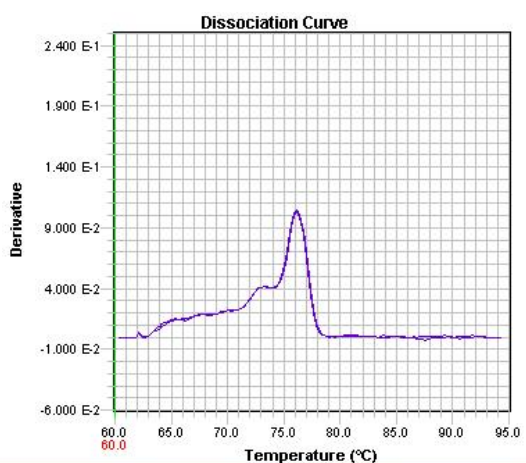
F3R3



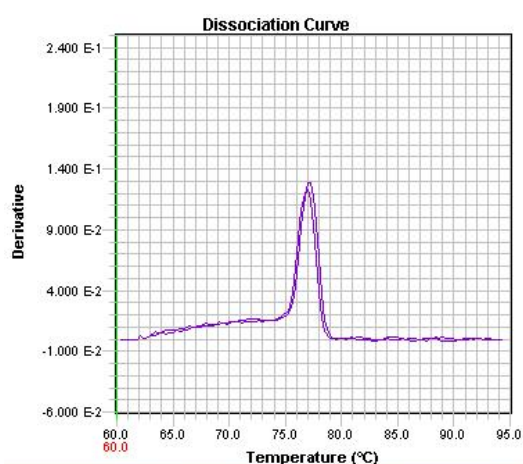
F1R1



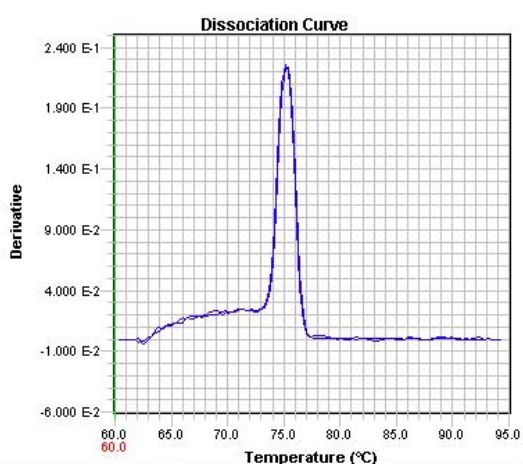
F4R4



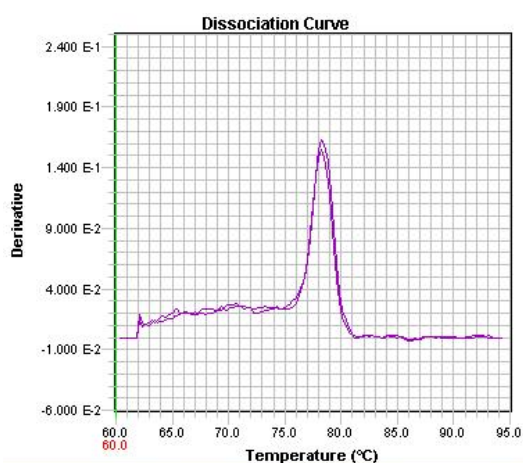
F5R5



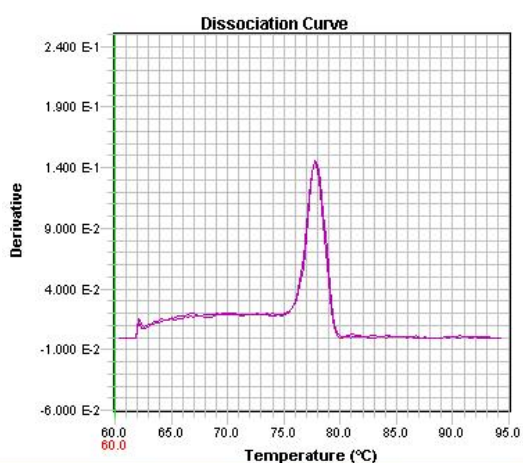
F2R2



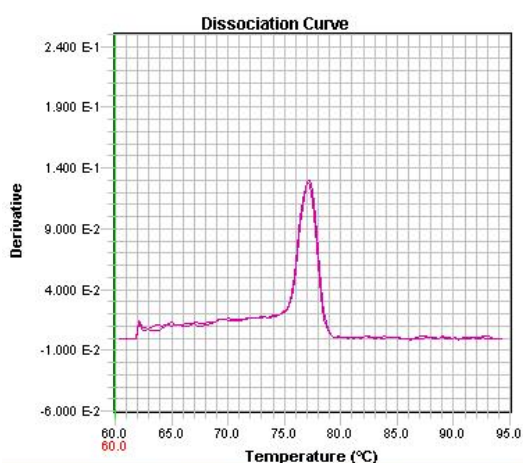
F6R6



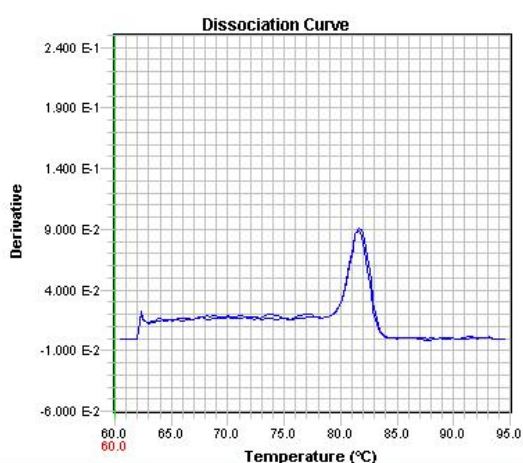
F7R7



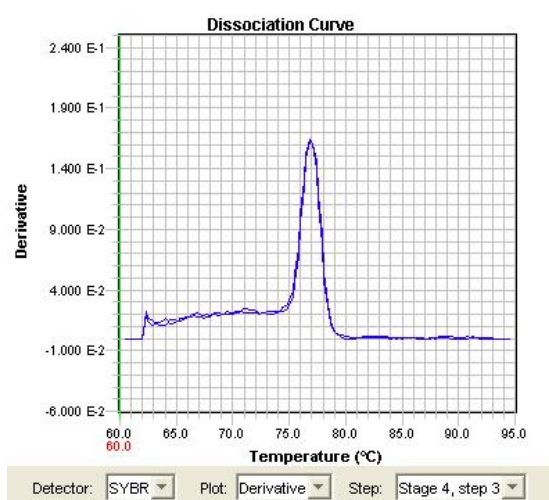
F8R8



F9R9



F10R10



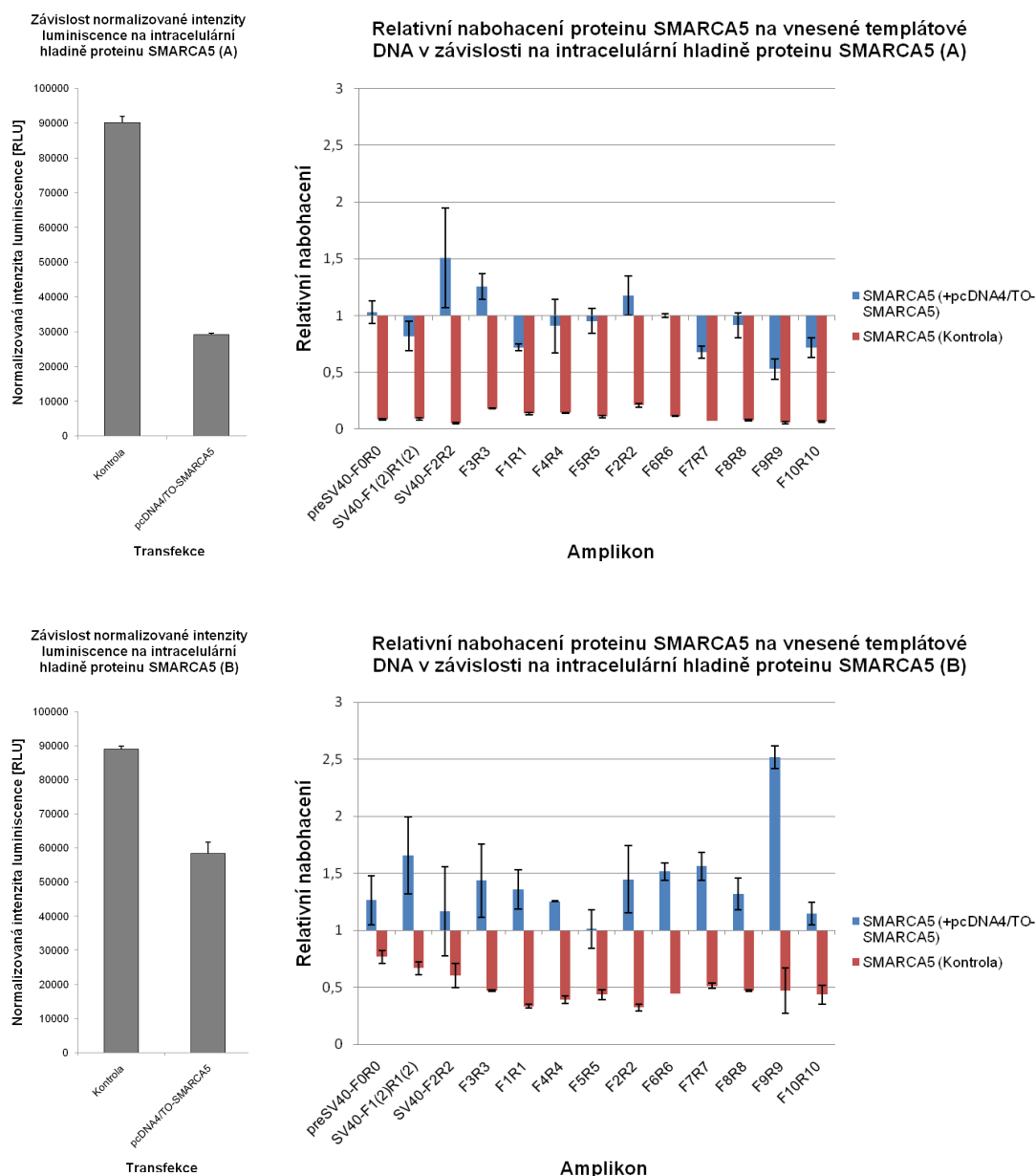
Graf 9-3: Grafy disociačních křivek specifických produktů, které vznikly při q-PCR za přítomnosti jednotlivých dvojic primerů. Software SDS, který je dodáván společně se cyklem 7900HT, je schopen spočítat hodnotu první derivace normalizované intenzity fluorescence při každé měřené teplotě a tu pak vynést do grafu. První derivace pak odpovídá velikosti změny fluorescence za dané teploty. Normalizovaná intenzita fluorescence je vypočtena jako podíl intenzit fluorescencí barvičky SYBR green I a barvičky pasivní reference. Ze zobrazených grafů můžeme vyčíst teploty tání specifických produktů jednotlivých reakcí PCR. Teplota tání specifického produktu odpovídá teplotě, při které je první derivace normalizované intenzity fluorescence nejvyšší (vrchol křivky). Grafy jsou seřazeny za sebou podle vzdálenosti od prvního amplikonu (preSV40-F0R0).

9.2 Objasnění chromatinových změn v podmínkách zvýšené exprese proteinu SMARCA5 v navrženém buněčném systému

9.2.1 Nabohacení proteinu SMARCA5 na reportéru a represe transkripce reportéru

Při testování různých koncentrací plazmidu pcDNA4/TO-SMARCA5 v transfekčních směsích jsme za pomoci reportérové analýzy zjistili, že zvýšená exprese proteinu SMARCA5 v buňkách HeLa má represivní vliv na transkripci reportérového enzymu Luciferázy. SMARCA5 je na ATP závislý chromatin remodelující faktor, který je, jak naznačují některé současné *in vitro* studie, schopný vázat nukleozomální i „holou“ (angl. naked) dvojřetězcovou DNA (He, Fan et al. 2006) prakticky ve všech všech transakcích, které se odehrávají na DNA. Na základě těchto a našich pozorování jsme předpokládali, že by mohlo snížení transkripce reportérového enzymu korelovat s přítomností proteinu SMARCA5 na vnesené templátové DNA. Pro testování této hypotézy byly nejprve provedeny dvě různé transfekce a to, vzhledem k potřebě velkého množství buněk, na 6-ti jamkových destičkách. První transfekce tzv. kontrolní obsahovala na jednu jamku 6-ti jamkové destičky množství 0,75 µg vektoru pGL3 promoter a 2,5 µg vektoru SK+. Druhá transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 obsahovala následující množství DNA: 0,75 µg vektoru pGL3 promoter, 0,5 µg vektoru pcDNA4/TO-SMARCA5 a 2 µg vektoru SK+ na jednu jamku 6-ti jamkové destičky. Celkem bylo pro každou transfekci použito 2×10^6 buněk. 48 h po transfekci byly buňky sklizeny, přibližně $1,5 \times 10^5$ z nich bylo podrobeno Luciferázové analýze a ze zbylých buněk byl izolován chromatin. Pro zajištění reproducibility získaných výsledků, byly všechny pokusy (transfekce, Luciferázové analýzy, ChIP a q-PCR) ještě jednou zopakovány a podle chronologie provedení označeny jako (A) a (B). Jak je vidět na grafech z Luciferázové analýzy jednotlivých transfekcí (viz. graf 9-4), buňky s vneseným vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 vykazovaly nižší normalizovanou intenzitu luminiscence oproti kontrole. Tímto bylo potvrzeno, že zvýšená exprese proteinu SMARCA5 v navrženém buněčném systému má represivní vliv na akumulaci reportérového enzymu Luciferázy. Abychom zjistili relativní nabohacení proteinu SMARCA5 na templátové DNA v těchto transfekcích, použili jsme izolovaný chromatin, který jsme následně inkubovali se specifickou protilátkou rozeznávající protein SMARCA5 (viz. 6.2.2 Chromatinová imunoprecipitace). Směsi fragmentů DNA, jež byly z jednotlivých transfekcí získány metodou ChIP, byly následně využity jako DNA templát pro q-PCR. Kvantitativní PCR směsí fragmentů DNA byla provedena pro všech 13

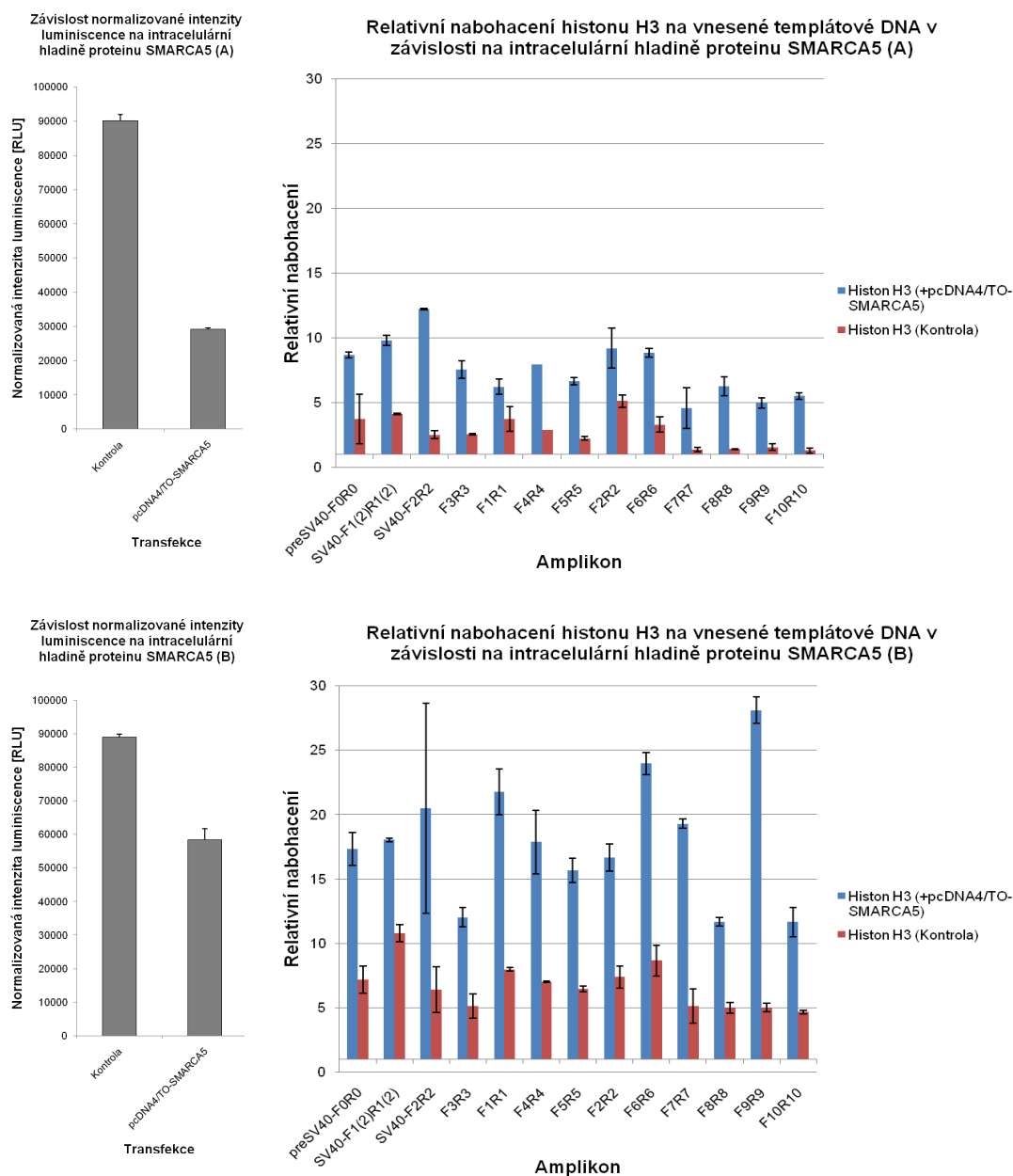
párů primerů (viz. 6.1.6 Primery) Abychom odhadli nespecifičnost specifické protilátky provedli jsme taktéž imunoprecipitaci chromatinu s kontrolní izotypovou protilátkou, která nerozeznávala žádný antigen. Hodnoty relativního nabohacení měřeného proteinu na vektoru pGL3 promoter byly vypočteny z hodnot koncentrací specifických DNA fragmentů obsažených v imunoprecipitaci se specifickou protilátkou (v tomto případě rozeznávající protein SMARCA5) vůči protilátce kontrolní. Normalizované hodnoty relativního nabohacení tedy udávají, kolikrát více je protein našeho zájmu nabohacen v konkrétním úseku vektoru pGL3 promoter oproti nespecifickému signálu. Tyto hodnoty byly vypočítány také pro protein SMARCA5 v kontrolní transfekci a v transfekci s pcDNA4/TO-SMARCA5 a vyneseny do grafů (viz. graf 9-4). Výsledky duplikovaných pokusů (A) i (B) ukazují, že v kontrolní transfekci prakticky nedocházelo k vazbě proteinu SMARCA5 na vnesenou templátovou DNA. Respektive hodnoty normalizovaného relativního nabohacení proteinu SMARCA5 byly, v případě kontrolní transfekce, ve všech měřených oblastech vektoru pGL3 promoter menší než jedna. Což znamená, že hodnoty relativního nabohacení proteinu SMARCA5 byly nižší než hodnoty nespecifické vazby. V případě buněčného systému se zvýšenou expresí proteinu SMARCA5, jsme byly schopni detekovat nabohacení tohoto proteinu na templátové DNA a to v obou duplikovaných pokusech (A) a (B). V pokusu (A) byla zjištěna přítomnost proteinu SMARCA5 pouze na třech, ze 13 pozorovaných míst vektoru pGL3 promoter (viz. graf 9-4 vpravo nahoře). Při zopakování pokusu [pokus (B)] jsme detekovali nabohacení proteinu SMARCA5 na téměř všech amplikonech templátové DNA (viz. graf 9-4 vpravo dole). Oblasti reportéru, které byly vymezeny primery F3R3 a F2R2, jeví přesvědčivé známky přítomnosti proteinu SMARCA5 v opakovaném experimentu. Rozdíl hodnot relativního nabohacení proteinu SMARCA5 mezi příslušnými amplikony obou pokusů pravděpodobně může souviset s odlišnou velikostí represe reportéru. V případě pokusu (A) dosahovala exprese Luciferázy po zvýšení intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 jedné třetiny kontroly. V pokusu (B) pak exprese dosahovala dvou třetin kontroly (viz. graf 9-4 vlevo nahoře a dole).



Graf 9-4: Luciferázové analýzy transfekovaných buněk pokusů (A) a (B) (grafy vlevo nahoře a vlevo dole), ze kterých byl následně izolován chromatin pro ChIP. Tyto analýzy ukazují nižší akumulaci enzymu Luciferáza v buňkách, do nichž byl mimo jiné transfekován plazmid pcDNA4/TO-SMARCA5, oproti kontrole. V pokusu (A) byl reportér po transfekci plazmidu pcDNA4/TO-SMARCA5 reprimován na třetinu transkripční aktivity kontroly. V pokusu (B) byl reportér reprimován na dvě třetiny transkripční aktivity kontroly. Chromatin, který byl vyizolován z transfekovaných buněk, byl precipitován se specifickou protilátkou proti proteinu SMARCA5 a získané fragmenty DNA byly využity pro kvantitativní PCR. Data z q-PCR byla zanalyzována a vynesena do grafů (vpravo nahoře a vpravo dole). Na grafech relativního nabohacení proteinu SMARCA5 pokusů (A) a (B) je zřetelné, že protein SMARCA5 nebyl na vneseném templátu kontrolní transfekce použitými metodami detekován (červené sloupce). V případě zvýšené exprese proteinu SMARCA5 v buňkách HeLa, již byl tento protein detekován na templátové DNA (modré sloupce). Konkrétně v pokusu (A) byly proteinem SMARCA5 nabohaceny přibližně tři sledované oblasti vektoru pGL3 promoter. Z toho oblasti F3R3 a F2R2 jeví přesvědčivé známky přítomnosti proteinu SMARCA5 v opakovaném experimentu. V pokusu (B) byla přítomnost tohoto proteinu detekována téměř ve všech měřených oblastech templátu.

9.2.2 Protein SMARCA5 ovlivňuje nabohacení histonu H3

Na základě publikovaných zdrojů je pravděpodobné, že po přenesení vektoru pGL3 promoter do buněk HeLa dochází k asociaci histonů s touto molekulou plazmidu a k vytvoření chromatinové struktury (Jeong and Stein 1994; Lukacs, Haggie et al. 2000). V eukaryotních buňkách obvykle dochází při změnách transkripční aktivity daného místa v chromozómu také ke změnám chromatinové struktury. Proto se zároveň domníváme, že při zvýšené hladině proteinu SMARCA5 v buňkách HeLa, s níž souvisí represe transkripce templátové DNA, může docházet, oproti kontrole, ke změnám této pravděpodobné struktury chromatinu. Pro otestování obou možností jsme provedli imunoprecipitaci vzorků chromatinu kontrolní transfekce a transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5, abychom zjistili relativní nabohacení templátové DNA histonem H3. Histon H3 byl vybrán záměrně, protože je součástí jader nukleozomů, tedy základní stavební jednotky eukaryotního chromatinu a také je předmětem postranlačních modifikací (např. H3K4Me3) na které jsme se zaměřili v dalších pokusech (viz. dále). Směsi fragmentů DNA z obou transfekcí, které byly získány metodou ChIP, byly následně použity pro q-PCR. Z analýzy výsledků q-PCR jsme zjistili, že se na vnesené templátové DNA skutečně vyskytují histony a tedy, že vzniká chromatinová struktura. Histon H3 byl nabohacen na všech námi zkoumaných místech transfekované templátové DNA (viz graf 9-5). Dále jsme zjistili, že nadprodukce proteinu SMARCA5 v navrženém buněčném systému způsobuje větší relativní nabohacení vnesené templátové DNA histonem H3 ve všech studovaných amplikonech oproti kontrole (viz graf 9-5). Je patrné, že nabohacení histonu H3 není stejnoměrné a v případě pokusu (A) dosahuje maxima ve dvou amplikonech (SV40-F2R2 a F2R2). Průměrné nabohacení je trojnásobné v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 pokusu (A) a 2,8-násobné v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 pokusu (B).

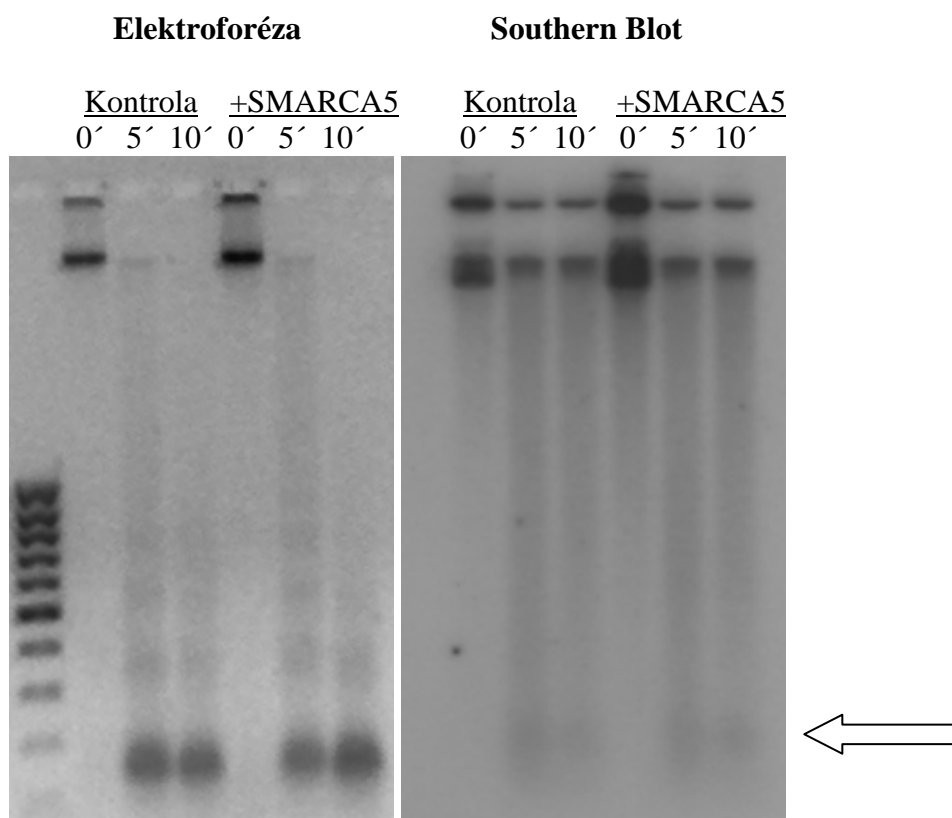


Graf 9-5: Luciferázové analýzy transfekovaných buněk pokusů (A) a (B) (grafy vlevo nahoře a vlevo dole), ze kterých byl izolován chromatin pro ChIP. Chromatin, který byl vyizolován z transfekovaných buněk, byl precipitován se specifickou protilátkou proti histonu H3 a získané fragmenty DNA byly využity pro kvantitativní PCR. Data z q-PCR byla zanalyzována a vynesena do grafů (vpravo nahoře a vpravo dole). Z grafu relativního nabohacení pokusů (A) i (B) je zřejmé, že se na vneseném vektoru pGL3 promotor vyskytovaly histony a to ve všech měřených oblastech tohoto templátu. Zároveň tyto grafy ukazují, že buňky se zvýšenou intracelulární hladinou proteinu SMARCA5, měly 48 h po transfekci vyšší normalizované hodnoty relativního nabohacení histonem H3 ve všech sledovaných amplikonech templátové DNA.

Předpokládali jsme, že by molekuly histonu H3, které byly nestejněměrně nabohacené na vnesené templátové DNA v případě kontrolního buněčného systému a systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5, mohly být součástí nukleozomálních struktur (Jeong and Stein 1994; Lukacs, Haggie et al. 2000). Rozhodli jsme se proto, tyto případné nukleozomální struktury detekovat. Pro detekci nukleozomů na vlákně DNA se velice často používá metoda založená na štěpení nechromatinizované DNA v chromatinu Mikrokovou nukleázou (zkráceně MNáza) s následnou analýzou fragmentů DNA za pomoci Southern blotu. Rozhodli jsme se proto tuto metodu také použít. Abychom získali chromatin vhodný pro štěpení enzymem MNáza museli jsme nejprve provést transfekce buněk. Provedli jsme dvě transfekce - kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Kvůli potřebě velkého množství chromatinu byla každá transfekce provedena na 6-ti jamkové destičce (plocha dna jamky 10 cm², ~5x10⁵ buněk na jamku) do 3x10⁶ buněk. Transfekční reakce kontroly obsahovala na jednu jamku 6-ti jamkové destičky 0,75 µg pGL3 promoter a 2,5 µg SK+. Transfekční reakce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 obsahovala na jednu jamku 6-ti jamkové destičky 0,75 µg pGL3 promoter, 0,5 µg pcDNA4/TO-SMARCA5 a 2 µg SK+. 48 h po transfekci byly buňky sklizeny, podrobeny Luciferázové analýze (~1,5x10⁵ buněk) a izolaci chromatinu. Luciferázová analýza ukázala, že v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 došlo v buňkách k výraznému snížení exprese reportérového enzymu Luciferáza. Hodnota normalizované intenzity luminiscence této transfekce odpovídala přibližně 21% hodnoty kontroly (data nejsou ukázána). Chromatin jednotlivých transfekcí byl izolován následujícím způsobem (viz. 6.2.3 Southern blot – Příprava chromatinu) a poté rozdělen do tří zkumavek pro inkubaci s MNázou. Do první zkumavky nebyla MNáza přidána, protože tato zkumavka sloužila především jako referenční vzorek chromatinu a nesla označení 0'. Tento referenční vzorek poskytoval informaci o tom, nakolik byl námi vyizolovaný chromatin fragmentován před přidáním MNázy. K chromatinu ve druhé a třetí zkumavce se již MNáza přidávala a tyto zkumavky jsme označili podle doby inkubace s touto nukleázou jako 5' a 10'. Po štěpení MNázou byla ve vzorcích chromatinu enzymaticky degradována veškerá RNA a proteiny (viz. 6.2.3 Southern blot – Štěpení MNázou). V takto ošetřených vzorcích zůstala pouze DNA, kterou jsme následně purifikovali a rozdělili na agarosovém gelu (na gel byly jednotlivé vzorky DNA naneseny ve stejné koncentraci). Je potřeba říci, že MNáza má schopnost vytvářet dvoj-řetězcové zlomy uvnitř tzv. linkerové DNA, tedy v polynukleotidovém úseku, jenž propojuje sousední dva nukleozómy. V případě DNA, jenž je vázána na histonový oktamer, je tato nukleáza schopná štěpit pouze v jednom řetězci. Z popsanych důvodů jsme mohli na elektroforetogramu, v závislosti na již

zmiňovaných reakčních podmínkách a době digesce, detekovat fragmenty DNA, které svojí délkou odpovídaly přibližně délce nukleozomální DNA a jejím násobkům (viz. obrázek 9-3 vlevo). Fragmenty DNA detekované na elektroforetogramu ovšem pocházely z veškeré buněčné DNA, jenž byla součástí nukleozomu. Abychom mohli mezi těmito fragmenty rozlišit ty, které by případně pocházely z nukleozomů vneseného templátu, použili jsme metodu Southern blot. V první části metody Southern blot byl proveden přenos fragmentů DNA z agarosového gelu na nylonovou membránu Hybond-N (viz. 6.2.3 Southern blot – Southern Blotting), tak aby mohly být tyto fragmenty použity pro hybridizaci se specifickou próbou. Je podstatné zmínit, že tento přenos zachovává pozice jednotlivých fragmentů DNA, tak jak byly umístěny v agarosovém gelu. To bylo velice důležité pro pozdější analýzu, protože jsme mohli mezi sebou porovnávat vzájemné pozice (velikosti) fragmentů genomické a plazmidové DNA. V další části metody Southern blot bylo nutné vytvořit hybridizační próby pro detekci vnesené templátové DNA respektive té oblasti, která kódovala enzym Luciferáza. Hybridizační próby jsme vytvořili amplifikací tří úseků genu Luciferázy za pomoci tří reakcí PCR. Tyto úseky byly vymezeny třemi dvojicemi primerů: F3R4, F5R6, F7R9 (viz. 6.1.6 Primery). Do reakcí PCR byl pro „zviditelnění“ hybridizačních prób přimíchán radioaktivní nukleotid [α - 32 P]dATP (viz. 6.2.3 Southern blot – Vytvoření hybridizačních prób). Po dokončení reakcí PCR jsme nasysntetizované hybridizační próby oddělili od neinkorporovaných nukleotidů na matrici Sephadex G-50 a následně všechny tři sloučili do jedné mikrozskumavky. Fragmenty DNA, jež byly imobilizované na nylonové membráně, jsme inkubovali s touto směsí hybridizačních prób za těchto podmínek (viz. 6.2.3 Southern blot – Hybridizační analýza). Po skončení hybridizace jsme hybridizační próby, které se nespecificky navázaly na nylonovou membránu, odmyli v několika krocích řadou promývacích roztoků (viz. 6.2.3 Southern blot – Hybridizační analýza). Posléze jsme membránu přenesli do desek s rentgenovým filmem a ten nechali 72 h exponovat. Na obrázku autoradiografu nylonové membrány jsou v každé řadě patrné intenzivně svítící pruhy, které pravděpodobně představují neštěpenou frakci vektoru pGL3 promotor (viz. obrázek 9-3). Ve spodní části tohoto obrázku jsou slabě detekované fragmenty DNA o přibližné velikosti 200 bp. Domníváme se, že se jedná o fragmenty DNA kódující oblasti reportérového enzymu Luciferáza, jež by mohly být nukleozomálního původu. Tyto slabě viditelné pruhy pravděpodobně nejsou nespecifitou, která by mohla být způsobena nedostatečným odmytím radioaktivní prób. Jelikož na autoradiografu není viditelný původně nespecificky pozitivní a následně odmytý DNA standard molekulových hmotností, domníváme se, že jsou tyto pruhy specifické. Při analýze autoradiografu jsme předpokládali, že pokud se na transfekované

molekuly vektoru pGL3 promotor vázalo v podmínkách zvýšené exprese proteinu SMARCA5 více histonů H3 (v průměru třikrát více oproti kontrole), jak ukazují naše výsledky, pak by na těchto molekulách mohlo dohromady vznikat i více případných nukleozomálních struktur. To by znamenalo, že s tím jak by v buňkách transfekovaných vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 docházelo pravděpodobně ke zvýšené tvorbě nukleozomů na molekulách vneseného templátu, tím silnější bychom detekovali signál na autoradiografu oproti kontrole. Z pruhů, jež jsme detekovali na autoradiografu, není ovšem patrný rozdíl v intenzitách mezi příslušnými inkubacemi v rámci výše popsaných transfekcí – kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Domníváme se, že při takto nízkých intenzitách signálu nemusí být případný trojnásobný rozdíl detekovatelný a naopak senzitivnější kvantitativní metody jako například ChIP mají významně vyšší výpovědní hodnotu.

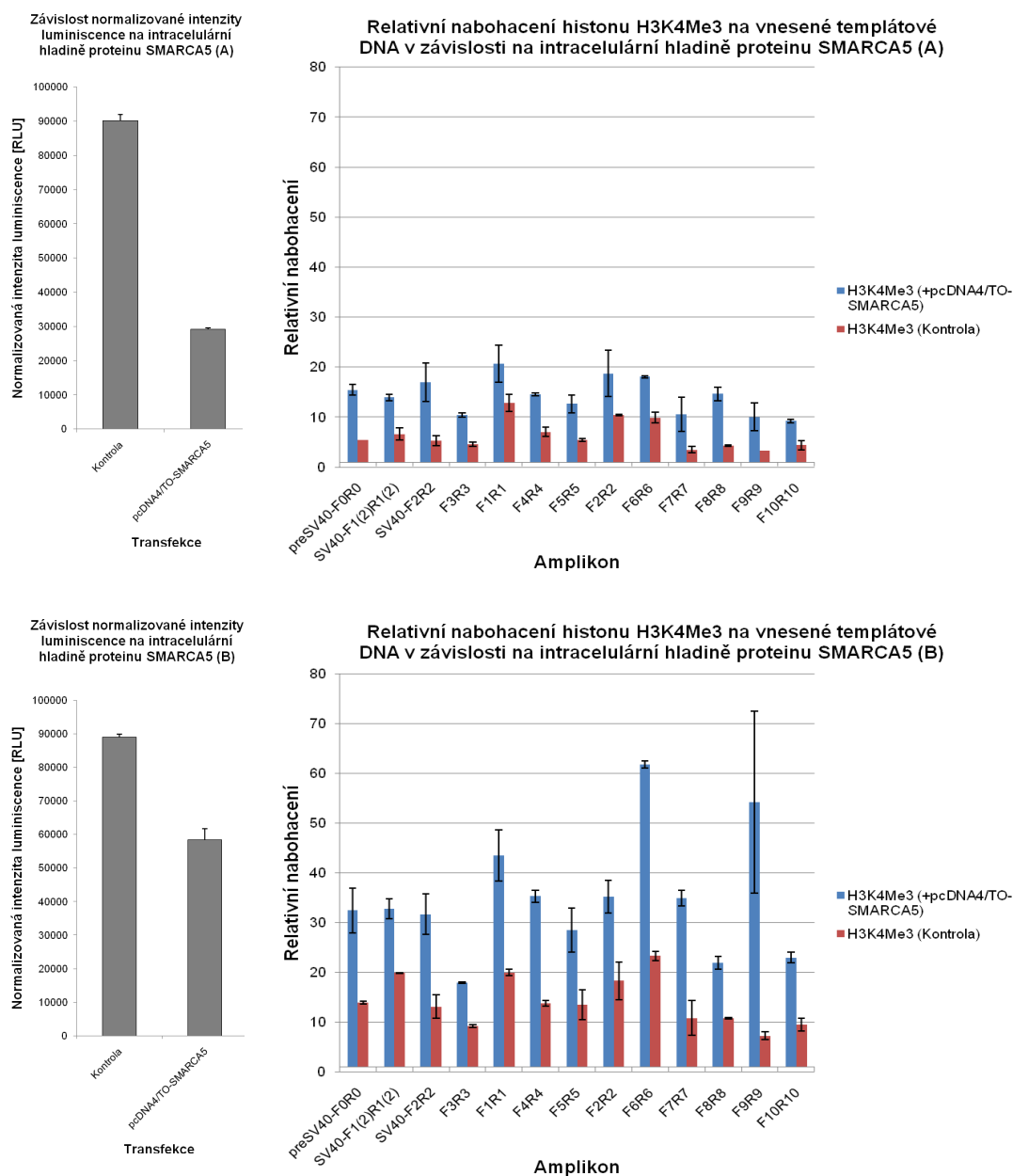


Obrázek 9-3: Elektroforetogram fragmentů DNA (vlevo), jež byly získány Mnázovou digescí chromatinu z transfekcí – kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Chromatin byl štěpen MNázou po dobu 5 min (5') a 10 min (10'). Neštěpený chromatin (0') sloužil jako referenční kontrola fragmentace. Na elektrogramu jsou patrné fragmenty nukleozomální DNA. Abychom mohli detekovat ty z fragmentů DNA, které pocházely z kódující oblasti genu Luciferáza, provedli jsme jejich analýzu za pomoci metody Southern blot (viz. 6.2.3 Southern blot). Na autoradiografu nylonové membrány jsou viditelné pruhy (viz. šipka) specificky hybridizované velmi pravděpodobně nukleozomální DNA reportérové oblasti vektoru pGL3 promotor.

9.2.3 SMARCA5 ovlivňuje histonové modifikace reportéru včetně

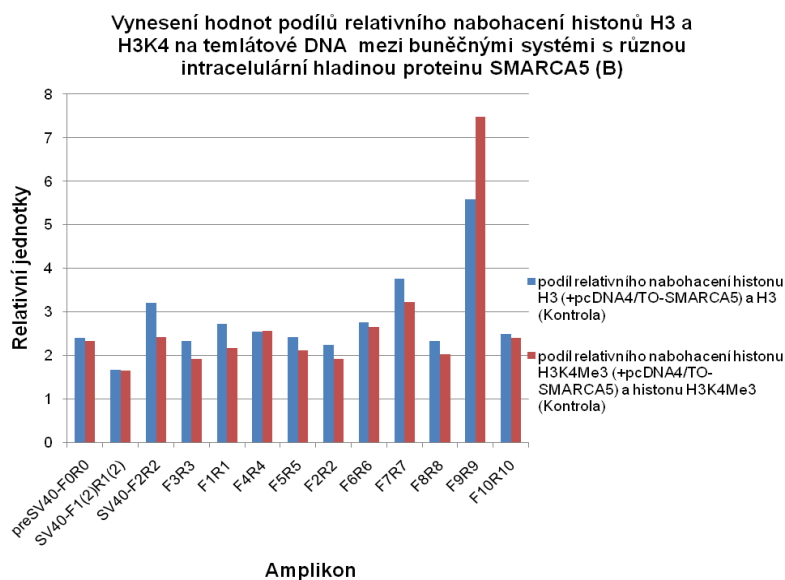
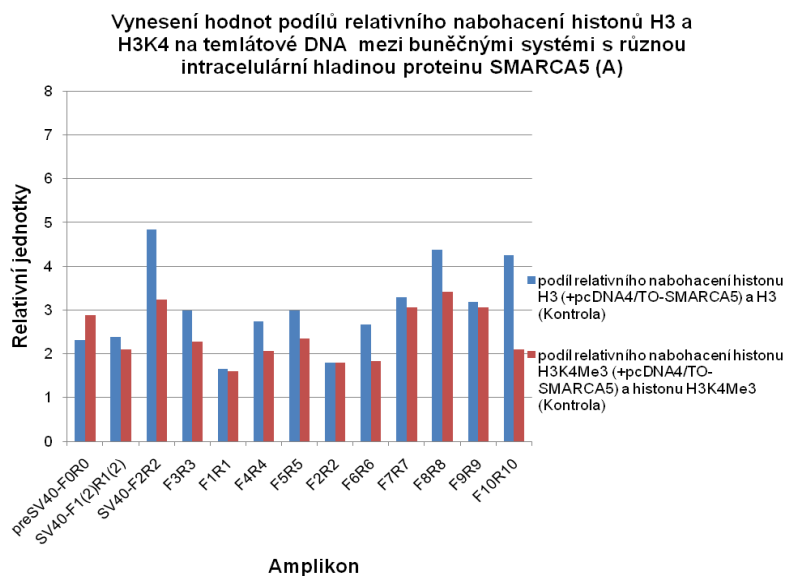
H3K4Me3

Zjistili jsme, že na transfekovaném vektoru pGL3 promotor se vyskytují histony a tvoří se zde chromatinová struktura. Protože může být chromatinová struktura buněk eukaryot regulována prostřednictvím posttranslačních modifikací histonů (Kouzarides 2007), zajímalo nás, jestli jsou histony na templátové DNA modifikovány a zdali na případné histonové modifikace bude mít vliv zvýšená hladina proteinu SMARCA5, jež má, zdá se, represivní účinek na transkripci. Pro testování naší hypotézy jsme provedli imunoprecipitaci chromatinu, který byl izolován z kontrolní transfekce a z transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5, se specifickou protilátkou proti histonu H3K4Me3. Zaměřili jsme se na postranslační modifikaci H3K4Me3 mimo jiné, protože se vyskytuje na histonu H3, tedy na histonu, který jsme již v předchozích pokusech na templátové DNA detekovali. Dalším důvodem výběru H3K4Me3 bylo, že se tento modifikovaný histon, jak naznačují některé současné komplexní analýzy kvasinkového genomu, vyskytuje především v chromatinových oblastech se zvýšenou transkripční aktivitou (Liu, Kaplan et al. 2005). Tyto závěry jsou platné i pro savčí chromatin (Kouzarides 2007). Z Luciferázových analýz kontrolní transfekce je zřejmé, že oblast vektoru pGL3 promotor, jenž kóduje reportérový enzym Luciferáza a na níž jsme zároveň studovali chromatinové změny, je oblastí s poměrně vysokou aktivitou transkripce (viz. graf 9-6). Z těchto důvodů jsme se domnívali, že by mohl být histon H3K4Me3, tedy alespoň v případě kontrolní transfekce, nabohacen na templátové DNA. Za pomoci metody ChIP jsme z chromatinu jednotlivých transfekcí získali fragmenty DNA, které odpovídaly vazebným místům histonu H3K4Me3. Byla provedena q-PCR těchto fragmentů DNA se 13 páry primerů (viz. 6.1.6 Primery). Získaná data z q-PCR byla zanalyzována a vynesena do grafů. Normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 z obou duplikovaných pokusů (A) a (B) naznačují, že byl tento histon přítomen ve všech studovaných oblastech templátové DNA a to jak v případě kontrolního buněčného systému, tak i v případě buněčného systému se zvýšenou expresí proteinu SMARCA5 (viz. graf 9-6). Oproti našemu očekávání byly normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3, v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5, téměř ve všech amplikonech až o polovinu vyšší vůči hodnotám kontrolní transfekce (viz. graf 9-6). Předpokládali jsme totiž, že by mohlo snížení transkripce reportérového enzymu v buňkách HeLa, které měly nadprodukovaný protein SMARCA5, korelovat spíše se snížením této transkripčně aktivační chromatinové „značky“ na molekule templátu.



Graf 9-6: Luciferázové analýzy transfekovaných buněk pokusů (A) a (B) (grafy vlevo nahoře a vlevo dole), ze kterých byl izolován chromatin pro ChIP. Imunoprecipitací izolovaných chromatinů se specifickou protilátkou proti H3K4Me3 byly získány fragmenty DNA, které byly využity pro q-PCR s 13 páry primerů. Z dat q-PCR byly vypočteny normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 na templátové DNA a ty následně vyneseny do grafu (vpravo nahoře a vpravo dole). Z těchto grafů obou duplikovaných pokusů (A) a (B) vyplývá, že histon H3K4Me3 byl na vnesené molekule templátu přítomen jak v případě kontrolní transfekce tak i v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 byly v případě buněčného systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5 téměř ve všech studovaných oblastech templátu až dvojnásobně vyšší oproti hodnotám kontrolního buněčného systému a to jak v pokusu (A), tak i v pokusu (B).

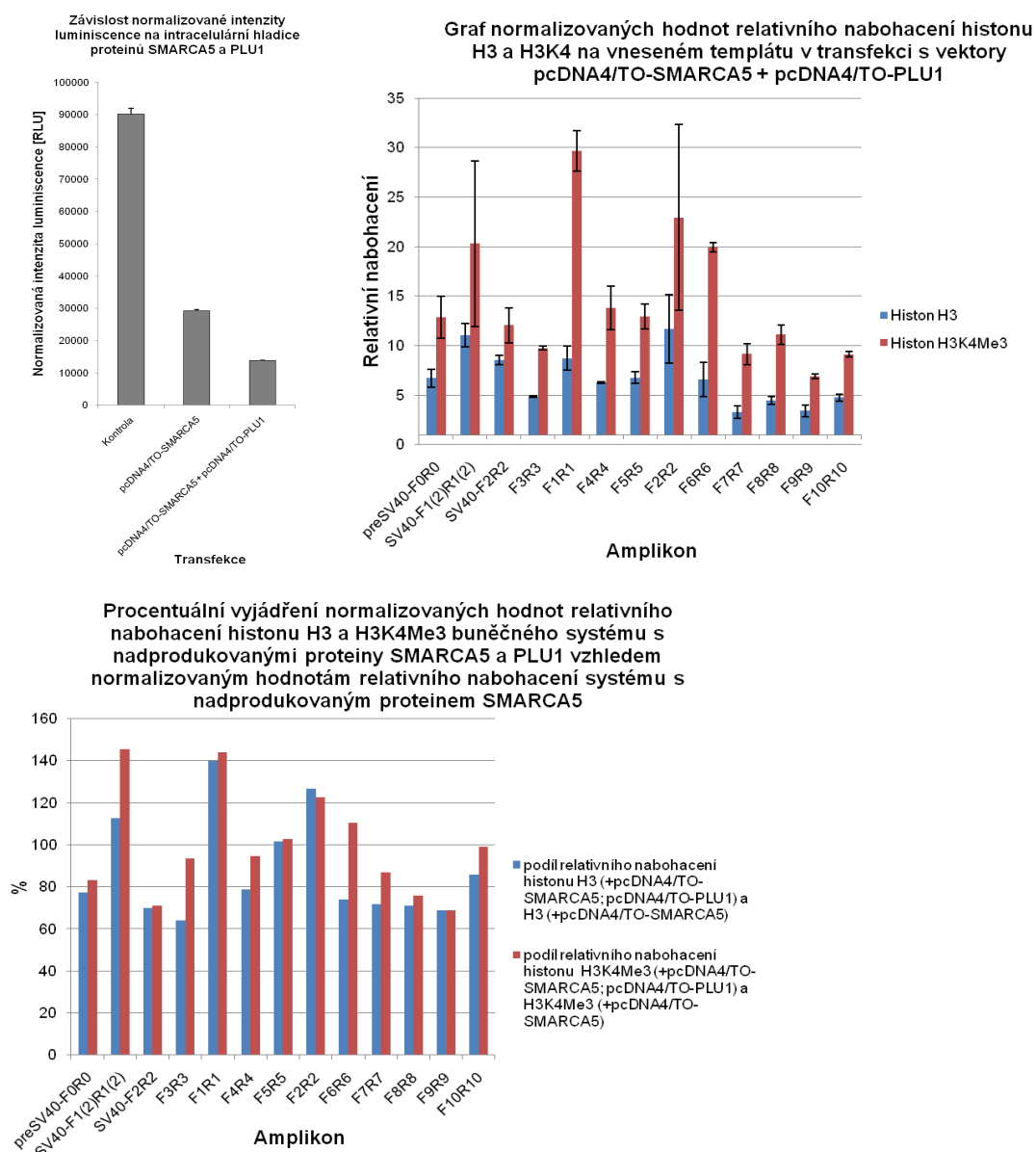
Ze získaných hodnot relativního nabohacení histonů H3 a H3K4Me3 na templátové DNA jsme se pokusili zjistit, zdali detekované zvýšení relativního nabohacení histonu H3K4Me3 v podmínkách nadprodukovaného proteinu SMARCA5 nesouvisí s případnou vzrůstající chromatinizací molekul templátu. Domnívali jsme se, že pokud porovnáme podíly relativního nabohacení histonu H3 buněčného systému se zvýšenou expresí proteinu SMARCA5 a hodnot relativního nabohacení histonu H3 kontrolního systému jednotlivých ampliconů s podíly histonu H3K4Me3, můžeme případné změny v chromatinizaci vnesených molekul templátu detekovat (viz. graf 9-7). V této analýze jsme použili hodnoty relativního nabohacení histonu H3, protože podobně jako hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 byly jedny z nejvyšších ze všech měřených proteinů. Z grafů [především grafu z pokusu (B)] je patrné, že zvýšení normalizovaných hodnot relativního nabohacení histonu H3 po nadprodukci proteinu SMARCA5 v buňkách je podobné a v některých případech téměř stejné [amplicon F2R2 v pokusu (A); amplicony SV40-F1(2)R1(2), F4R4 v pokusu (B)] jako v případě histonu H3K4Me3. Tyto analýzy naznačují, že detekované zvýšení nabohacenosti templátové molekuly proteinem H3K4Me3 je v buněčném systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5 pravděpodobně způsobeno chromatinizací většího počtu vnesených molekul vektoru pGL3 promoter oproti kontrole.



Graf 9-7: V grafech pokusů (A) a (B) jsou vyneseny podíly normalizovaných hodnot relativního nabohacení histonu H3 buněčného systému se zvýšenou expresí proteinu SMARCA5 a normalizovaných hodnot relativního nabohacení histonu H3 v kontrolním systému. V grafu jsou také zobrazeny podíly histonu H3K4Me3 spočítané analogickým způsobem. Tyto grafy naznačují, že zvýšení relativního nabohacení histonu H3 a H3K4Me3 na vneseném templátu v buněčném systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5, mělo téměř ve všech měřených amplikonech podobnou tendenci vůči kontrole.

Abychom se ujistili, že detekované vyšší nabohacení histonu H3K4Me3 na vneseném templátu je v případě buněčného systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5 skutečně specifické, pokusili jsme se histony H3K4Me3 na templátové DNA demethylovat. Pro tento účel jsme si vybrali vektor pcDNA4/TO-PLU1, který umožňuje díky svému CMV promotoru vysokou expresi proteinu PLU-1 v buňkách (Scibetta, Santangelo et al. 2007). Protein PLU-1 je specifická demethyláza lyzinu v pozici 4 na histonu H3 (Xiang, Zhu et al. 2007). Jak naznačují některé současné studie, které se zabývají analýzou histonových modifikací za pomoci imunofluorescenčního barvení, pokud je uměle zvýšena exprese proteinu PLU-1 v buňkách, pak 48 h po transfekci je u těchto buněk detekovatelné značné snížení intracelulární hladiny H3K4Me3 (Christensen, Agger et al. 2007; Yamane, Tateishi et al. 2007). Domnívali jsme se proto, že by zvýšená exprese proteinu PLU-1 v buněčném systému s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 mohla také výrazně ovlivnit námi naměřené nabohacení templátové DNA histonem H3K4Me3. Před provedením ChIP jsme, ale nejprve museli provést optimalizaci transfekce buněk. Podobně jako v případě ostatních plazmidů (pGL3 promotor, pcDNA4/TO-SMARCA5 a SK+) bylo potřeba zjistit pomocí Luciferázové analýzy optimální koncentraci vektoru pcDNA4/TO-PLU1 v transfekční reakci. Z popsanych důvodů bylo provedeno několik testovacích transfekcí na 12-ti jamkové destičce (plocha dna jamky 4 cm²; ~2x10⁵ buněk na jamku) a po 48 h byly tyto transfekce podrobeny Luciferázové analýze. Při vyhodnocování Luciferázové analýzy jsme předpokládali, že se zvýšenou hladinou exprese proteinu PLU-1 v buňkách HeLa bude docházet k demethylaci histonů H3K4Me3 na vnesené molekule templátu a zároveň jsme také předpokládali, že tato demethylační aktivita bude mít vliv na represi transkripce reportérového enzymu Luciferáza. Některé práce totiž naznačují, že protein PLU1 funguje jako represor transkripce *in vivo* v případě jeli navázán do oblasti před promotorem Luciferázového genu reportérového plazmidu (Tan, Shaw et al. 2003). Ukazuje se, že represe transkripce proteinem PLU-1 může být přímo spojena s jeho demethylační aktivitou, tedy s odstraňováním posttranslační modifikace histonu H3K4, která silně koreluje s aktivní expresí genů (Yamane, Tateishi et al. 2007). Z tohoto důvodu jsme tedy za optimální považovali takovou koncentraci vektoru pcDNA4/TO-PLU1 v transfekční reakci, která by měla výrazný represivní vliv na expresi proteinu Luciferáza. Takováto koncentrace odpovídala hodnotě 0,8 µg (data nejsou ukázána). Buňky určené pro ChIP (celkem ~2 mil. buněk) byly transfekovány v 6-ti jamkové destičce (plocha dna jamky 10 cm², ~5x10⁵ buněk na jamku). Transfekční směs pro jednu jamku 6-ti jamkové destičky obsahovala následující plazmidy: pGL3 promotor (0,75 µg), pcDNA4/TO-SMARCA5 (0,5 µg) a pcDNA4/TO-PLU1 (2 µg). Je potřeba zmínit, že tato transfekce, tak

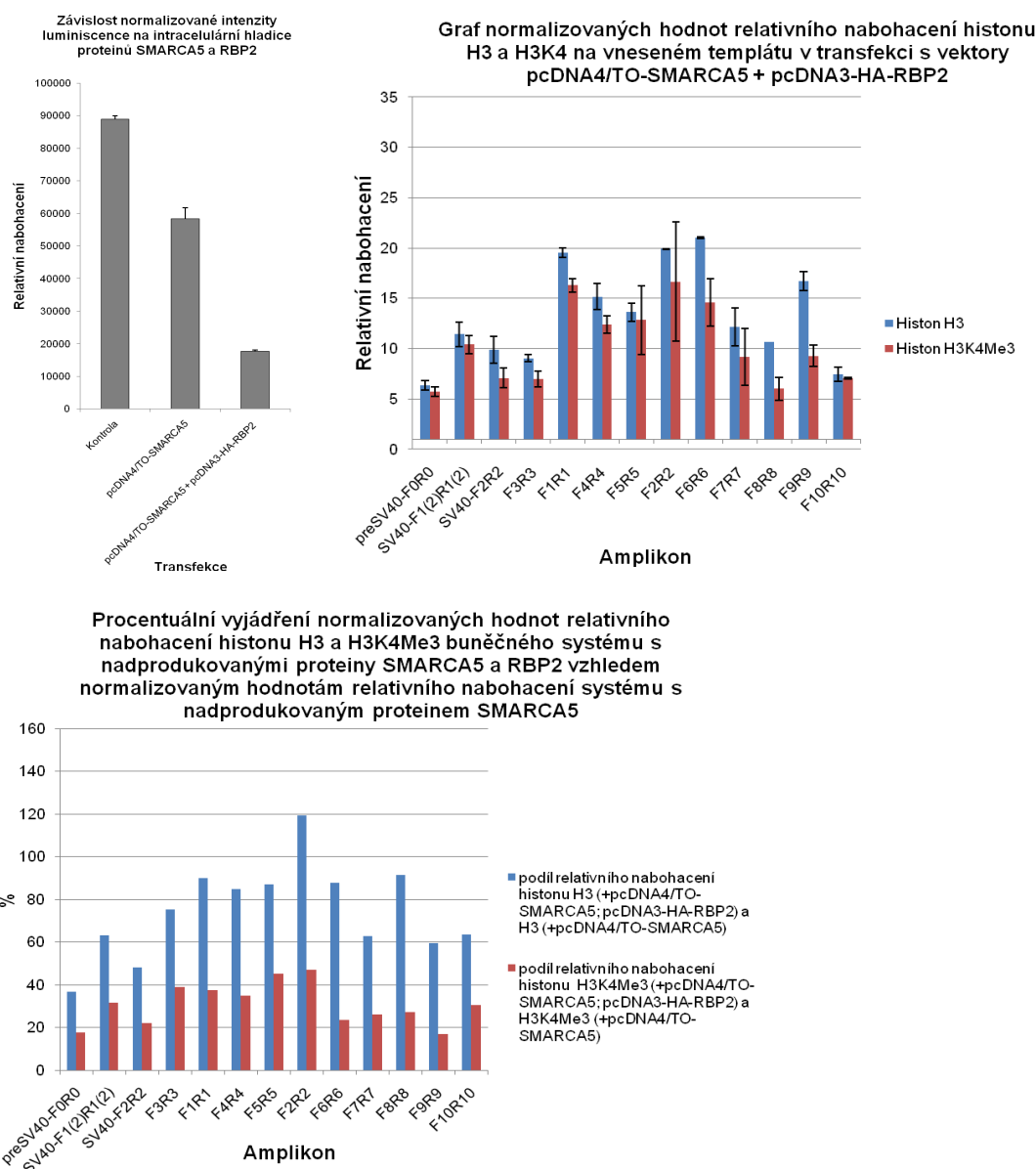
aby se z ní získaná data dala porovnávat s ostatními, byla provedena ve stejnou dobu jako transfekce – kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 pokusu (A). 48 h po transfekci byly buňky sklizeny, podrobeny Luciferázové analýze ($\sim 1,5 \times 10^5$ buněk) a izolaci chromatinu. Luciferázová analýza jasně ukazuje, že po zvýšení exprese proteinu PLU-1 společně s proteinem SMARCA5 v buňkách dochází k ještě vyšší represi exprese reportérového enzymu než v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 (viz. graf 9-8 vlevo nahoře). Izolovaný chromatin byl inkubován s protilátkami proti histonu H3 a histonu H3K4Me3. Fragmenty DNA získané metodou ChIP byly použity na q-PCR se 13 páry primerů (viz. 6.1.6 Primery). Data z q-PCR byla následně analyzována a z nich vypočtené normalizované hodnoty relativního nabohacení byly vyneseny do grafu (viz. graf 9-8 vpravo nahoře). Určení relativního nabohacení histonu H3 na templátové DNA v tomto buněčném systému bylo důležité z hlediska porovnávání s transfekcí s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Domnívali jsme se totiž, že zvýšená hladina proteinu PLU-1 v buňkách může ovlivnit nejen expresi reportéru, ale také expresi ostatních kotransfekovaných plazmidů. Předpokládali jsme, že by se tedy mohly intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 mezi oběma porovnávanými transfekcemi lišit. Proto abychom mohli mezi buněčnými systémy, které mohou mít různé hladiny proteinu SMARCA5, pozorovat specifickou demethylaci H3K4Me3 na vneseném templátu, vytvořili jsme následující graf (viz. graf 9-8 vlevo dole). Na grafu je znázorněno procento normalizovaných hodnot relativního nabohacení histonu H3 a H3K4Me3 (transfekce s pcDNA4/TO-SMARCA5; pcDNA4/TO-PLU1) z příslušných normalizovaných hodnot relativního nabohacení transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Z tohoto grafu je patrné, že ve srovnání s transfekcí s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 se hodnoty nabohacení histonu H3K4Me3 v některých studovaných oblastech templátové DNA po nadprodukci proteinu PLU-1 prakticky neměnily (amplikony F5R5 a F10R10). V některých oblastech templátové DNA byly tyto hodnoty dokonce vyšší [SV40-F1(2)R1(2) (oblast promotoru); F1R1, F2R2, F6R6 (kódující oblast reportérového enzymu)]. V ostatních měřených oblastech templátové DNA byly normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 nižší oproti hodnotám z transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Toto snížení by mohlo souviset s demethylační aktivitou nadprodukovaného proteinu PLU-1, ale vzhledem k tomu, že docházelo také k nižšímu nabohacení histonu H3 v těchto oblastech molekuly templátu, nepokládali jsme demethylační aktivitu proteinu PLU-1 za signifikantní (viz graf 9-8 dole).



Graf 9-8: Luciferázová analýza buněk, které byly transfekované vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a pcDNA4/TO-PLU1, ukazuje, že v těchto buňkách docházelo k nižší expresi reportérového enzymu Luciferáza oproti kontrolní transfekci a transfekci s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA (vlevo nahoře). Tento výsledek naznačuje, že nadprodukce proteinu PLU-1 v buňkách má velice represivní vliv na expresi reportéru. Data z q-PCR fragmentů DNA, jež byly získány inkubací chromatinu (chromatin z buněk transfekovaných vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a pcDNA4/TO-PLU1) se specifickou protilátkou proti histonům H3 a H3K4Me3, byla zanalyzována a vynesena do grafu (vpravo nahoře). Abychom mohli detekovat případnou demethylaci vnesené templátové molekuly, vzhledem k předpokladu, že porovnáváné buněčné systémy měly pravděpodobně odlišné hladiny proteinu SMARCA5, vytvořili jsme následující graf (vlevo dole). Je na něm znázorněno jaké procento tvoří normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3 a H3K4Me3 (transfekce s pcDNA4/TO-SMARCA5; pcDNA4/TO-PLU1) z příslušných normalizovaných hodnot relativního nabohacení transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Z něj můžeme vyčíst, že v určitých studovaných oblastech vektoru pGL3 promotor mohlo docházet k demethylaci [preSV40-F0R0, SV40-F2R2 (promotor); F3R3, F4R4, F7R7, F8R8, F9R9 (kódující oblast)]. Případnou demethylační aktivitu v těchto oblastech jsme ovšem nepokládali za signifikantní, protože zde současně docházelo také ke snižování nabohacení histonem H3.

Jelikož nebyla demethylace molekul histonu H3K4Me3 na vneseném templátu při zvýšené intracelulární hladině proteinu PLU-1 průkazná, rozhodli jsme se, že využijeme demethylační aktivitu jiného proteinu – proteinu RBP2. Tento protein je podobně jako PLU-1 také specifickou demethylázou histonu H3K4Me3 a společně s proteinem PLU-1 patří do rodiny enzymů JARID1, jež specificky demethylují histon H3K4. Pokud je protein RBP2, jak naznačují některé současné studie zabývající se nepřímou imunofluorescencí histonových modifikací, uměle v buňkách nadprodukován, způsobuje těmto buňkám výrazné snížení intracelulární hladiny histonu H3K4Me3 (Christensen, Agger et al. 2007; Klose, Yan et al. 2007). Opět, jako v případě proteinu PLU-1, jsme se proto domnívali, že by jeho demethylační aktivita mohla mít vliv na histonové modifikace vneseného templátu v buněčném systému se zvýšenou hladinou SMARCA5. Vysokou expresi proteinu RBP2 v buňkách HeLa nám zajišťoval vektor pcDNA3-HA-RBP2, jenž obsahuje kódující oblast genu RBP2 pod kontrolou CMV promotoru (Klose, Yan et al. 2007). Před provedením transfekcí do velkého počtu buněk ($\sim 2 \times 10^6$), které vyžaduje chromatinová imunoprecipitace, bylo nejprve nutné zjistit optimální koncentraci vektoru pcDNA3-HA-RBP2 v transfekční reakci. Uskutečnili jsme proto několik testovacích transfekcí na 12-ti jamkové destičce (plocha dna jamky 4 cm^2 ; $\sim 2 \times 10^5$ buněk na jamku) do buněk HeLa s různými koncentracemi tohoto vektoru. Buňky HeLa byly 48 h po transfekci sklizeny a podrobeny Luziferázové analýze. Podobně jako v případě proteinu PLU-1 jsme při výběru optimální koncentrace vektoru pcDNA3-HA-RBP2 v transfekční reakci předpokládali, že by demethylační aktivita nadprodukováného proteinu RBP2 mohla mít transkripčně represivní vliv na reportérový enzym Luciferáza. Nejvyšší represi transkripce reportérového enzymu (nejnižší hodnotu normalizované intenzity luminiscence), která pravděpodobně naznačovala nízký methylační stupeň lyzinů v pozici 4 na histonech H3 nabohacených na vnesené templátové DNA, jsme detekovali v transfekci s $0,8 \text{ }\mu\text{g}$ vektoru pcDNA3-HA-RBP2 (data nejsou ukázána). Pro potřeby metody ChIP jsme na 6-ti jamkové destičce (plocha dna jamky 4 cm^2 ; $\sim 2 \times 10^5$ buněk na jamku) transfekovali $\sim 2 \times 10^6$ buněk HeLa následujícími plazmidy: pGL3 promoter ($0,75 \text{ }\mu\text{g}$), pcDNA4/TO-SMARCA5 ($0,5 \text{ }\mu\text{g}$) a pcDNA3-HA-RBP2 ($2 \text{ }\mu\text{g}$) (v závorkách jsou uvedena množství jednotlivých plazmidů v transfekční reakci pro jednu jamku 6-ti jamkové destičky). Podobně jako v případě proteinu PLU-1 jsme tuto transfekci provedli současně s transfekcemi – kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 [nyní ovšem z pokusu (B)], kvůli tomu abychom mohli následně získaná data z q-PCR porovnávat s daty ostatních transfekcí. 48 h po transfekci jsme buňky sklídili, podrobili Luciferázové analýze ($\sim 1,5 \times 10^5$ buněk) a izolovali z nich chromatin. Z grafu Luciferázové analýzy je patrné, že u buněk, které

nadprodukovaly proteiny SMARCA5 a RBP2 došlo k velice signifikantnímu propadu normalizované intenzity luminiscence jak oproti kontrole tak i oproti transfekci s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 (viz. graf 9-9 vlevo nahoře). Abychom zjistili zdali na tuto výraznou represi transkripce reportérového enzymu mohla mít vliv demethylace histonů jeho kódující oblasti, provedli jsme imunoprecipitaci chromatinu transfekce - pcDNA4/TO-SMARCA5; pcDNA3-HA-RBP2 - se specifickou protilátkou proti histonům H3 a H3K4Me3. Fragmenty DNA, které jsme získali imunoprecipitací chromatinu, byly použity na q-PCR se 13 páry primerů (viz. 6.1.6 Primery). Následně jsme z dat q-PCR vypočetli normalizované hodnoty relativního nabohacení obou studovaných histonů na templátové DNA a ty vynesli do grafu (viz graf 9-9 vpravo nahoře). Opět, jako v případě proteinu PLU-1, abychom mohli mezi buněčnými systémy, které mohou mít různé hladiny proteinu SMARCA5, pozorovat specifickou demethylaci histonu H3K4Me3 na vneseném templátu, vytvořili jsme následující graf (viz graf 9-9 vlevo dole). Z něj můžeme vyčíst, že normalizované hodnoty relativního nabohacení histonu H3K4Me3 se snížily v případě buněčného systému s nadprodukovanými proteiny SMARCA5 a RBP2 na 20-40% příslušné hodnoty relativního nabohacení H3K4Me3 transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Také je na tomto grafu vidět i propad (tedy až na ampikon F2R2) normalizovaných hodnot relativního nabohacení histonu H3 oproti příslušným hodnotám relativního nabohacení histonu H3 transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5. Ovšem propad hodnot relativního nabohacení u histonu H3 nebyl tak výrazný jako u hodnot histonu H3K4Me3, což naznačuje, že v buněčném systému se zvýšenou expresí proteinu RBP2 docházelo skutečně k demethylaci. Tímto jsme potvrdili, že detekované vyšší nabohacení histonu H3K4Me3 na vneseném templátu je v případě buněčného systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5 skutečně specifické.



Graf 9-9: Luciferázová analýza buněk, které byly transfekovány vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a pcDNA3-HA-RBP2, ukazuje, že v těchto buňkách docházelo k výrazně nižší expresi proteinu Luciferáza vzhledem k transfekcím – kontrolní a s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 (vlevo nahoře). Tento výsledek naznačuje, že nadprodukce proteinu RBP2 v buňkách HeLa má velice represivní vliv na transkripci reportérového enzymu Luciferázy vneseného templátu. Abychom mohli data, jež byla získána analýzou buněk transfekce vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a pcDNA3-HA-RBP2, porovnávat s daty ostatních transfekcí, byla tato transfekční reakce provedena ve stejnou dobu s ostatními ve druhém pokusu - pokusu (B). Pomocí imunoprecipitace chromatinu buněk (transfekované vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a pcDNA3-HA-RBP2) s následnou q-PCR fragmentů DNA, jsme získali informaci o relativním nabohacení histonů H3 a H3K4Me3 na vnesené molekule templátu. Normalizované hodnoty relativního nabohacení histonů H3 a H3K4Me3 byly vyneseny do grafu (vpravo nahoře). Předpokládali jsme, že se porovnávané buněčné systémy (s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 a vektory pcDNA4/TO-SMARCA5; pcDNA3-HA-RBP2) pravděpodobně liší v intracelulárních hladinách proteinu SMARCA5, proto jsme opět pro detekci demethylace molekuly vneseného templátu vytvořili následující graf (vlevo dole). Z grafu je patrné, že po nadprodukci proteinu RBP2 docházelo v buňkách k nižšímu nabohacení templátové molekuly jak histonem H3 (výjimkou je oblast amplikonu F2R2) tak histonem H3K4Me3 oproti buňkám bez vektoru pcDNA3-HA-RBP2. Ovšem snížení euchromatinové

„značky“ H3K4Me3 bylo mnohem rapidnější vzhledem k histonu H3. Z popsaných důvodů se domníváme, že v této transfekci docházelo k demethylaci histonu H3K4Me3 na molekule templátu.

10 Diskuse

V této diplomové práci bylo popsáno vytvoření systému pro studium chromatin remodelujícího faktoru SMARCA5 a jeho optimalizace. Tento systém využívá koncept transfekované templátové DNA do buněk s následnou detekcí na ní nabohacených proteinů za pomoci chromatinové imunoprecipitace. Součástí tohoto konceptu je, že vnesená templátová DNA obsahuje i reportérový gen, který umožňuje měřit vztah aktuální regulace transkripce k endogenní popřípadě uměle zvýšené hladině chromatin remodelačního či jiného transkripci ovlivňujícího faktoru. Buněčné systémy založené na podobném principu popsala ve svých studiích řada autorů (Zhou, Santoro et al. 2002; Rekhtman, Choe et al. 2003; Lavrrar and Farnham 2004). Například autoři (Zhou, Santoro et al. 2002) použili vektor pMr1930-BH (Budde and Grummt 1999) pro zjišťování vlivu remodelačního komplexu NoRC na RNA polymerázou I katalyzovanou transkripci *in vivo*. Vektor pMr1930-BH obsahuje zaklonovaný ribozomální reportérový gen a z tohoto důvodu byl těmito autory použit pro transfekci do buněčné linie myších fibroblastů NIH3T3, kde produkoval definovaný RNA transkript o velikosti 700 nukleotidů. Pokud byl s tímto vektorem kotransfekován vektor uměle zvyšující expresi proteinu TIP5 (velká podjednotka komplexu NoRC), byla produkce RNA transkriptu z vektoru pMr1930-BH silně inhibována. Tyto výsledky autorům naznačovaly, že *in vivo* funkce chromatin remodelačního komplexu NoRC je pravděpodobně represe transkripce RNA polymerázy I. Autoři se dále zaměřili na případné změny histonových modifikací vnesené templátové DNA. Za tímto účelem provedli chromatinovou imunoprecipitaci se specifickou protilátkou proti acetylovanému histonu H4 (α -AcH4) a získané fragmenty DNA amplifikovaly pomocí PCR. Zjistili, že pozorovaná transkripční represe RNA polymerázy I v buněčném systému, v němž byla zvýšena hladina proteinu TIP5, koreluje s deacetylací histonů H4 přítomných na promotoru ribozomálního reportérového genu. Podobným způsobem tito autoři vyvolali represi transkripce RNA polymerázy I a deacetylaci histonů H4 v promotorové oblasti také u endogenní rDNA, což ukazuje hodnověrnost dat získaných za pomoci transfekovaného templátu. Autoři (Rekhtman, Choe et al. 2003) využili systém transfekovaného reportéru pro detekci vzájemné interakce dvou transkripčních faktorů PU.1 a GATA-1 *in vivo*. Především je zajímavé, zdali transkripční faktor PU.1 může interagovat s GATA-1 v době, kdy GATA-1 váže DNA. Pro tento účel použili vektor α D3 Luc, jenž nesl reportérový luciferázový gen pod kontrolou α -globinového promotoru. Z předchozích měření luciferázové chemiluminiscence tito autoři totiž věděli, že transaktivace konstruktů α D3 Luc faktorem GATA-1 je silně reprimována proteinem PU.1 ovšem nevěděli, zdali je způsobená

vzájemnou interakcí obou faktorů přímo na DNA promotoru (Rekhtman, Radparvar et al. 1999). Provedli několik transfekčních reakcí tohoto konstruktu α D3 Luc s různými kombinacemi expresních vektorů, které kódovaly proteiny GATA-1, PU.1-HA (kvůli následné detekci obsahoval tento protein hemagglutininovou značku) a mutantní formy PU.1. Za pomoci imunoprecipitace chromatinu s protilátkami proti GATA-1 a HA zjistili, že na protein PU.1 může skutečně vázat protein GATA-1 *in vivo*, v případě jeli vázán na DNA (α -globinovém promotoru). Jiní autoři (Lavrrar and Farnham 2004) použili metodu „transientní chromatinové imunoprecipitace“ pro detekci vazebného místa transkripčního faktoru E2F1 v proximální promotorové oblasti genu Carboxylesterázy. Rodina transkripčních faktorů E2F sestává z devíti členů, kteří jsou často redundantní v některých svých funkcích. Ukazuje se ovšem, že pro expresi genu myší Carboxylesterázy je esenciální pouze faktor E2F1 (Wells, Graveel et al. 2002). Z popsanych důvodů autoři zaklonovali 800, 650, 590, 530 a 380 bp dlouhé úseky proximální promotorové oblasti tohoto genu do reportérového vektoru pAAlucA. Vytvořené konstrukty vnesli do efektivně transfekovatelných buněk 293 a za pomoci ChIP detekovali vazbu endogenního faktoru E2F1. Faktor E2F1 byl detekován pouze na konstruktech 800, 650 a 590, z čehož autoři usoudili, že vazebné místo E2F1 musí ležet v promotorové oblasti někde mezi 590 bp a 530 bp. Aby zjistili, jakou roli hraje tato faktorem E2F1 vázaná oblast v aktivaci transkripce, kotransfekovali konstrukty 590 a 530 s plazmidem exprimujícím wt protein E2F1. Z Luciferázové analýzy transfekovaných buněk bylo podle předpokladů zjištěno, že transkripční aktivita konstruktů 590 byla vyšší než v případě konstruktů 530. Výsledky získané kombinací metod ChIP a vneseného reportéru tedy naznačují, že transientní transfekční systém je velice vhodný pro sledování specifické vazby a regulace transkripce endogenními nebo vnesenými transaktivačními faktory.

Na vnesené templátové DNA byla za pomoci navrženého buněčného systému ukázána přítomnost molekul histonu H3. Vazba histonů na transfekovaný plazmid byla pozorována i dalšími autory (Jeong and Stein 1994; Zhou, Santoro et al. 2002), což naznačuje, že se u eukaryotních buněk jedná pravděpodobně o přirozený jev. Dále bylo MNázovým štěpením chromatinu a analýzou Southern blotem ukázáno, že navázané histony zřejmě vytváří struktury, které délkou na nich vázané DNA připomínají nukleozómy. Výsledky tedy naznačují, že po transfekci do buněk je plazmidová DNA, jenž vstoupí do jádra, předmětem vazby histonů a vytváří se nukleoproteinová struktura připomínající nativní chromatin (Mladenova, Mladenov et al. 2009).

Pomocí námi navrženého a otestovaného buněčného systému byla detekována přítomnost modifikovaného histonu H3K4Me3, což naznačuje, že histony modifikující

enzymy jsou přenášeny na transfekovaný templát. Podobná data ukázali ve své práci i jinde (Zhou, Santoro et al. 2002). Tito autoři zároveň ukázali, že mechanismus regulace transkripce vneseného reportérového genu templátové DNA respektive jeho represe, je za určitých podmínek velice podobný endogenním genům. Z popsanych důvodů se domníváme, že regulace transkripce na vneseném templátu může být zajišťována stejnými buněčnými mechanizmy jako v případě transkripce chromozomálních genů. V souladu s předchozími pozorováními jsme na vysoce transkribovaném genu, který vnesená templátová DNA obsahuje, detekovali poměrně značné nabohacení histonu H3K4Me3 a to ve všech studovaných amplikonech (Liu, Kaplan et al. 2005).

Pomocí námi navrženého modelového systému byla v případě transfekce s vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5, ukázána přítomnost manipulovaného chromatin remodelujícího faktoru SMARCA5 na templátové DNA. Zvýšení intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 expresním vektorem pcDNA4/TO-SMARCA5 v buňkách zároveň mělo i represivní vliv na transkripci reportérového genu. Výsledky tedy ukazují, že nabohacení proteinu SMARCA5 na reportéru koreluje s represí jeho transkripce. Jak bylo ukázáno dále, zvýšená hladina proteinu SMARCA5 korelovala také s vyšším nabohacením histonů H3 a H3K4Me3 na templátové DNA. Ze získaných dat se domníváme, že detekované vyšší nabohacení obou histonů je způsobeno spíše chromatinizací vyššího počtu molekul transfekovaného templátu než důsledkem regulačních změn v transkripci. Proto jsme se rozhodli zhodnotit nabohacení histonu H3 v oblasti promotoru před a po zvýšení hladiny proteinu SMARCA5. In vitro studie naznačují, že pro úspěšnou aktivaci transkripce je nutné remodelovat oblast promotoru, tedy rozvolnit jeho strukturu chromatinu (LeRoy, Orphanides et al. 1998; LeRoy, Loyola et al. 2000). Jestliže budeme předpokládat, že všechny histony H3 na DNA templátu jsou součástí nukleozómu, pak bychom mohli detekovat změny v nabohacení promotorových amplikonů molekulami histonů H3 (nukleozómů) vzhledem k amplikonům kódující oblasti genu Luciferázy a to před a po zvýšení hladiny proteinu SMARCA5. Takovéto změny jsme však nepozorovali. Pravděpodobné vyšší zapojení molekul transfekovaného templátu do chromatinizace tedy nevede ke zvýšení genové exprese v časové posloupnosti našich experimentů, ale k poklesu genové exprese. Je teoreticky možné, že exprese reportéru a jeho vyšší zapojení do chromatinizace bude reflektovat aktivní změny chromatinové struktury a povede v delší časové ose ke zvýšení genové exprese, toto tvrzení však nemůžeme zatím podpořit vědeckými výsledky.

Závěrem diskuse lze říci, že jsme vytvořili a otestovali velmi citlivý kvantitativní systém, který je schopen detekovat citlivé změny v transkribovaném genu a který současně

bere v potaz vývoj nové chromatinové struktury na vneseném templátu. Tato chromatinová struktura nese známky, jež se nacházejí v oblasti genů v genomu, jako například histonové modifikace či nukleozómová periodicitu. S využitím tohoto systému, který v podobném nikoli stejném experimentu použili i jiní autoři (Zhou, Santoro et al. 2002; Rekhtman, Choe et al. 2003; Lavrrar and Farnham 2004), jsme dokázali identifikovat nové vztahy remodelace chromatinu k transkripci. Domníváme se, že naše data, jež připravujeme k publikačnímu výstupu, naznačují, že chromatinová remodelace v buněčném systému s nadprodukovaným proteinem SMARCA5 má transientně represivní vliv na transkripci a mimikuje její represi, aniž by docházelo k poklesu histonových modifikací asociovaných s transkripcí (včetně H3K4Me3).

11 Závěr

- Byl vytvořen a optimalizován buněčný systém pro studium chromatin nemodelačního faktoru SMARCA5.
- Za pomoci tohoto buněčného systému byla na molekule transfekované templátové DNA zjištěna přítomnost proteinu SMARCA5 a byl ukázán represivní vliv zvýšené intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 na transkripci reportérového enzymu Luciferáza.
- Za pomoci námi navrženého buněčného systému byla na molekule transfekované templátové DNA zjištěna přítomnost histonu H3, což souvisí pravděpodobně s vytvořením chromatinové struktury.
- Za pomoci námi navrženého buněčného systému byla na molekule transfekované templátové DNA zjištěna přítomnost histonu H3K4Me3, což ukazuje, že jsou na tuto molekulu přenášeny endogenní histon-modifikační enzymy.
- Bylo ukázáno, že zvýšená intracelulární hladina proteinu SMARCA5 má pravděpodobně vliv na vyšší zapojení molekul DNA do chromatinizace a tím na relativní (ale již ne absolutní) nabožení histonu H3 a modifikovaného histonu H3K4Me3 na molekule transfekované templátové DNA.
- Bylo ukázáno, že k represi transkripce vneseného reportéru v důsledku zvýšené intracelulární hladiny proteinu SMARCA5 pravděpodobně dochází způsobem, který nezahrnuje pokles histonové modifikace asociované s transkripcí H3K4Me3.

12 Seznam použité literatury

- Aalfs, J. D., G. J. Narlikar, et al. (2001). "Functional differences between the human ATP-dependent nucleosome remodeling proteins BRG1 and SNF2H." J Biol Chem **276**(36): 34270-8.
- Aihara, T., Y. Miyoshi, et al. (1998). "Cloning and mapping of SMARCA5 encoding hSNF2H, a novel human homologue of Drosophila ISWI." Cytogenet Cell Genet **81**(3-4): 191-3.
- Bakshi, R., T. Prakash, et al. (2004). "In silico characterization of the INO80 subfamily of SWI2/SNF2 chromatin remodeling proteins." Biochem Biophys Res Commun **320**(1): 197-204.
- Benevolenskaya, E. V., H. L. Murray, et al. (2005). "Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation." Mol Cell **18**(6): 623-35.
- Boyer, L. A., R. R. Latek, et al. (2004). "The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 158-63.
- Bozhenok, L., P. A. Wade, et al. (2002). "WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci." EMBO J **21**(9): 2231-41.
- Budde, A. and I. Grummt (1999). "p53 represses ribosomal gene transcription." Oncogene **18**(4): 1119-24.
- Cairns, B. R. (2007). "Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies." Nat Struct Mol Biol **14**(11): 989-96.
- Cavellan, E., P. Asp, et al. (2006). "The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription." J Biol Chem **281**(24): 16264-71.
- Clayton, A. L., S. Rose, et al. (2000). "Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation." EMBO J **19**(14): 3714-26.
- Collins, N., R. A. Poot, et al. (2002). "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin." Nat Genet **32**(4): 627-32.
- Dorigo, B., T. Schalch, et al. (2003). "Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail." J Mol Biol **327**(1): 85-96.
- Grune, T., J. Brzeski, et al. (2003). "Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI." Mol Cell **12**(2): 449-60.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." Oncogene **20**(24): 3021-7.
- He, X., H. Y. Fan, et al. (2008). "Diverse regulation of SNF2h chromatin remodeling by noncatalytic subunits." Biochemistry **47**(27): 7025-33.
- He, X., H. Y. Fan, et al. (2006). "Human ACF1 alters the remodeling strategy of SNF2h." J Biol Chem **281**(39): 28636-47.
- Chong, S., N. Vickaryous, et al. (2007). "Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse." Nat Genet **39**(5): 614-22.
- Christensen, J., K. Agger, et al. (2007). "RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3." Cell **128**(6): 1063-76.
- Ito, T., M. E. Levenstein, et al. (1999). "ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly." Genes Dev **13**(12): 1529-39.
- Jeong, S. W. and A. Stein (1994). "DNA sequence affects nucleosome ordering on replicating plasmids in transfected COS-1 cells and in vitro." J Biol Chem **269**(3): 2197-205.
- Jones, M. H., N. Hamana, et al. (2000). "A novel family of bromodomain genes." Genomics **63**(1): 40-5.

- Jonsson, Z. O., S. Jha, et al. (2004). "Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex." *Mol Cell* **16**(3): 465-77.
- Klose, R. J., Q. Yan, et al. (2007). "The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase." *Cell* **128**(5): 889-900.
- Kokavec, J., J. Podskocova, et al. (2008). "Chromatin remodeling and SWI/SNF2 factors in human disease." *Front Biosci* **13**: 6126-34.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* **128**(4): 693-705.
- Lavrrar, J. L. and P. J. Farnham (2004). "The use of transient chromatin immunoprecipitation assays to test models for E2F1-specific transcriptional activation." *J Biol Chem* **279**(44): 46343-9.
- Lazzaro, M. A. and D. J. Picketts (2001). "Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l." *J Neurochem* **77**(4): 1145-56.
- LeRoy, G., A. Loyola, et al. (2000). "Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin." *J Biol Chem* **275**(20): 14787-90.
- LeRoy, G., G. Orphanides, et al. (1998). "Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro." *Science* **282**(5395): 1900-4.
- Li, J., G. Langst, et al. (2006). "NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes." *EMBO J* **25**(24): 5735-41.
- Liu, C. L., T. Kaplan, et al. (2005). "Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*." *PLoS Biol* **3**(10): e328.
- Loyola, A., J. Y. Huang, et al. (2003). "Functional analysis of the subunits of the chromatin assembly factor RSF." *Mol Cell Biol* **23**(19): 6759-68.
- Loyola, A., G. LeRoy, et al. (2001). "Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription." *Genes Dev* **15**(21): 2837-51.
- Lu, P. J., K. Sundquist, et al. (1999). "A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer." *J Biol Chem* **274**(22): 15633-45.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-60.
- Lukacs, G. L., P. Haggie, et al. (2000). "Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus." *J Biol Chem* **275**(3): 1625-9.
- Macdonald, N., J. P. Welburn, et al. (2005). "Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3." *Mol Cell* **20**(2): 199-211.
- Mayer, C., K. M. Schmitz, et al. (2006). "Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes." *Mol Cell* **22**(3): 351-61.
- Mladenova, V., E. Mladenov, et al. (2009). "Organization of plasmid DNA into nucleosome-like structures after transfection in eukaryotic cells." *Biotechnol. & Biotechnol. Eq*: 1044-7.
- Nakagawa, T., M. Bulger, et al. (2001). "Multistep chromatin assembly on supercoiled plasmid DNA by nucleosome assembly protein-1 and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor." *J Biol Chem* **276**(29): 27384-91.
- Owen-Hughes, T. and J. L. Workman (1994). "Experimental analysis of chromatin function in transcription control." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **4**(4): 403-41.
- Percipalle, P., N. Fomproix, et al. (2006). "The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription." *EMBO Rep* **7**(5): 525-30.

- Poot, R. A., L. Bozhenok, et al. (2005). "Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance?" Cell Cycle **4**(4): 543-6.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, et al. (2004). "The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci." Nat Cell Biol **6**(12): 1236-44.
- Precht, P., A. L. Wurster, et al. (2010). "The SNF2H chromatin remodeling enzyme has opposing effects on cytokine gene expression." Mol Immunol **47**(11-12): 2038-46.
- Rekhtman, N., K. S. Choe, et al. (2003). "PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation." Mol Cell Biol **23**(21): 7460-74.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, et al. (1999). "Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells." Genes Dev **13**(11): 1398-411.
- Richmond, T. J. and C. A. Davey (2003). "The structure of DNA in the nucleosome core." Nature **423**(6936): 145-50.
- Santoro, R., J. Li, et al. (2002). "The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription." Nat Genet **32**(3): 393-6.
- Scibetta, A. G., S. Santangelo, et al. (2007). "Functional analysis of the transcription repressor PLU-1/JARID1B." Mol Cell Biol **27**(20): 7220-35.
- Shogren-Knaak, M., H. Ishii, et al. (2006). "Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions." Science **311**(5762): 844-7.
- Sivolob, A. and A. Prunell (2003). "Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs." J Mol Biol **331**(5): 1025-40.
- Stopka, T. and A. I. Skoultschi (2003). "The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14097-102.
- Stopka, T., D. Zakova, et al. (2000). "Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia." Leukemia **14**(7): 1247-52.
- Strohner, R., A. Nemeth, et al. (2001). "NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines." EMBO J **20**(17): 4892-900.
- Strohner, R., A. Nemeth, et al. (2004). "Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin." Mol Cell Biol **24**(4): 1791-8.
- Tan, K., A. L. Shaw, et al. (2003). "Human PLU-1 Has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9." J Biol Chem **278**(23): 20507-13.
- Vargova, J., K. Vargova, et al. (2009). "Nuclear localization of ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) in mouse." Front Biosci (Elite Ed) **1**: 553-9.
- Wells, J., C. R. Graveel, et al. (2002). "The identification of E2F1-specific target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3890-5.
- Xiang, Y., Z. Zhu, et al. (2007). "JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19226-31.
- Yamamoto, Y., U. N. Verma, et al. (2003). "Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression." Nature **423**(6940): 655-9.
- Yamane, K., K. Tateishi, et al. (2007). "PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation." Mol Cell **25**(6): 801-12.
- Yang, J. G., T. S. Madrid, et al. (2006). "The chromatin-remodeling enzyme ACF is an ATP-dependent DNA length sensor that regulates nucleosome spacing." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1078-83.

- Zhou, Y. and I. Grummt (2005). "The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing." Curr Biol **15**(15): 1434-8.
- Zhou, Y., R. Santoro, et al. (2002). "The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription." EMBO J **21**(17): 4632-40.